

**Adhäsionsinhibition von primären humanen  
Linsenepithelzellen in vitro durch den T-Typ-  
Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Friederike Kunz

*urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0011-6*

Betreuer der Arbeit: PD Dr. habil. J.G. Barbara Nebe

1. Gutachter: PD Dr. habil. J.G. Barbara Nebe

Zentrum für Medizinische Forschung, Arbeitsbereich Zellbiologie  
Medizinische Fakultät Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter G. Weiss

Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl f. Tierphysiologie  
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
Universität Rostock

Datum der Einreichung: 23. Dezember 2008

Datum der Verteidigung: 23. November 2009

*Under havet mødes alle øer.*  
*(Dänisches Sprichwort)*

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Stand der Forschung .....	3
2.1	Nachstar-Entstehung .....	3
2.2	Nachstar-Prävention .....	5
2.3	Zelladhäsion im Linsenepithel .....	6
2.3.1	Zellverbindungen .....	6
2.3.2	Integrine und Zytoskelettverankerung .....	8
2.3.3	Einfluss der Integrin-vermittelten Zelladhäsion auf zelluläre Prozesse.....	11
2.4	Bedeutung von Kalzium für zelluläre Prozesse .....	12
2.4.1	Kalzium-Haushalt.....	12
2.4.2	Kalzium und Zellproliferation .....	14
2.4.3	Kalzium und Zelltod .....	16
2.5	Kalziumkanäle und Kalziumkanal-Antagonisten.....	19
2.5.1	Kalziumkanäle .....	19
2.5.2	Spannungsabhängige Kalziumkanäle .....	21
2.5.3	Der Kalziumantagonist Mibefradil .....	23
3	Zielsetzung und Fragestellung .....	26
4	Material und Methoden.....	27
4.1	Testsubstanzen .....	28
4.1.1	T-Kalziumkanalblocker Mibefradil.....	28
4.1.2	Alternativer T-Kalziumkanalblocker Ethosuximid.....	28
4.1.3	L-Kalziumkanalblocker Nifedipin.....	29
4.2	Humane Zellkultur.....	29
4.2.1	Gewinnung und Kultur primärer humaner Linsenepithelzellen .....	29
4.2.2	Primäre humane Fibroblasten .....	31
4.2.3	Primäre humane Hornhautendothelzellen .....	31
4.2.4	Zelllinie HLE-B3.....	31
4.2.5	Zelllinie mHepR1 .....	32
4.3	Lichtmikroskopische Analyse primärer humaner Hornhautendothel-zellen.....	32
4.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen primärer humaner Linsenepithelzellen.....	33
4.4.1	Prinzip der direkten und indirekten Immunfluoreszenzfärbung.....	33
4.4.2	Nachweis der Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen.....	34
4.4.3	Nachweis des Tight-Junction-assoziierten Proteins Zonula occludens I (ZO-1) .....	35
4.4.4	Fluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts.....	35
4.4.5	Nachweis der glattmuskulären Aktin-Isoform $\alpha$ -Smooth muscle actin.....	36
4.4.6	Nachweis später Apoptosestadien durch TUNEL.....	36



4.4.7	Nachweis früher Apoptosestadien .....	37
4.4.8	Apoptose-Nachweis durch Caspase-3-Aktivität .....	38
4.4.9	Apoptose-Nachweis durch das proapoptotische Protein Bax .....	38
4.4.10	Analyse der basalen Kontaktfläche von hLEZ .....	39
4.5	Rasterelektronenmikroskopie .....	39
4.5.1	Prinzip und Probenvorbereitung .....	39
4.5.2	Darstellung der Zelloberfläche von hLEZ und primären Kaninchen- Hornhaut-Endothelzellen .....	40
4.6	Durchflusszytometrische Messungen .....	41
4.6.1	Prinzip .....	41
4.6.2	Analyse der Expression von Integrin-Untereinheiten in HLE-B3 Zellen .....	42
4.6.3	Nachweis frühapoptotischer Stadien in HLE-B3 (Annexin-V-FITC) .....	42
4.6.4	Messung von Proliferation und Apoptose in HLE-B3-Zellen .....	43
4.7	Elektrophysiologische Untersuchungen mit der Patch Clamp-Technik .....	43
4.7.1	Prinzip .....	43
4.7.2	Durchführung .....	45
4.8	Statistik .....	47
5	Ergebnisse .....	49
5.1	Phänotypische Charakterisierung primärer humaner Linseneithelzellen .....	49
5.1.1	Morphologie .....	49
5.1.2	Extrazelluläre Matrixproteine .....	50
5.1.3	Vergleich des Aktin-Zytoskeletts in hLEZ und HLE-B3 Zellen .....	51
5.1.4	Expression von $\alpha$ -Smooth muscle actin .....	52
5.1.5	Zell-Zell-Verbindungen am Beispiel der Tight Junctions (Zonulae occludentes) .....	53
5.1.6	Integrin-Expression .....	56
5.1.7	Elektrophysiologische Bestimmung ausgewählter spannungsabhängiger Stromkomponenten von whole cell-Strömen in hLEZ .....	56
5.2	Einfluss des T-Typ Kalziumkanal-Blockers Mibefradil auf das Adhäsionsverhalten humaner Linseneithelzellen .....	59
5.2.1	Zellmorphologie primärer humaner LEZ .....	59
5.2.2	Änderung der Kontaktfläche von hLEZ unter Mibefradil-Einfluss .....	60
5.2.3	Expression des Tight junction Proteins ZO-1 in primären humanen LEZ .....	60
5.2.4	Integrinexpression von HLE-B3 Zellen .....	61
5.3	Einfluss des T-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockers Mibefradil auf die Zellmorphologie primärer Hornhautendothelzellen .....	62
5.4	Einfluss des T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf die Streulichteigenschaften von HLE-B3 Zellen .....	65
5.5	Einfluss des T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine primärer hLEZ .....	66
5.6	Untersuchungen zur Apoptose in humanen Linseneithelzellen .....	69

5.6.1	Nachweis der Phosphatidylserin-Exposition auf der Zellmembranaussenseite von hLEZ und HLE-B3	69
5.6.2	Intrazelluläre Verlagerung des proapoptotischen Proteins Bax	72
5.6.3	Caspase-3-Aktivität	72
5.6.4	Effekt des T-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockers Mibefradil auf die DNA und das F-Aktinzytoskelett	73
5.6.5	Effekt des alternativen T-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockers Ethosuximid auf die DNA und das F-Aktinzytoskelett	74
5.6.6	Effekt des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockers Nifedipin auf die DNA und das F-Aktinzytoskelett	75
5.6.7	Proliferation und Apoptose von HLE-B3 Zellen unter Mibefradil	76
5.7	Wirkung von Mibefradil auf Ionenströme in hLEZ	77
6	Diskussion	80
6.1	Phänotyp-Charakterisierung anteriorer Linseneithelzellen und deren Eignung als Nachstarmodell	80
6.2	Einfluss des T-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Antagonisten Mibefradil auf Zellfunktionen primärer humane Linseneithelzellen	84
6.3	Einfluss von Kalziumkanal-Antagonisten auf Zytoskelett und Apoptose primärer humaner Linseneithelzellen	86
7	Zusammenfassung	95
8	Literatur	97
9	Anhang	117
9.1	Abkürzungen	117
9.2	Abbildungsverzeichnis	118
9.3	Tabellenverzeichnis	120
9.4	Lösungen, Puffer und Medien	121
9.5	Verwendete elektrophysiologische Messprotokolle	124
9.5.1	Messprotokolle zur Erfassung spannungsaktivierter nicht-inaktivierender Membranströme	124
9.5.2	Messprotokolle zur Erfassung spannungsaktivierter inaktivierender Membranströme	124

Anlagen: Erklärung

Lebenslauf

wissenschaftliche Beiträge im Rahmen des DFG-Projektes Nr. NE 560/5-1

Dank

# 1 Einleitung

Trübungen der Augenlinse werden unabhängig von ihrer Ursache als Katarakt oder grauer Star bezeichnet. Die durch altersbedingte Gewebeveränderungen hervorgerufene senile Katarakt oder auch Grauer Altersstar stellt dabei die weitaus häufigste Katarakt-Form dar. Diese Augenkrankheit kann operativ behandelt werden, wobei die getrübe Linse entfernt und durch eine Intraokularlinse ersetzt wird. Nach extrakapsulärer Staroperation kann es jedoch in bis zu 50% der Fälle zur Ausbildung eines Nachstars (Cataracta secundaria) kommen (z.B. Kappelhof & Vrensen 1992, Hollick et al. 1999). Der Nachstar stellt damit die häufigste Komplikation der primären Kataraktchirurgie dar. Zwar ist die Nachstarrate in den letzten Jahren und Jahrzehnten gesunken (11,8 % ein Jahr nach OP, 20,7 % 3 Jahre nach OP, 28,4 % 5 Jahre nach OP (Bertelmann & Kojetinsky 2001), doch ist dies vor allem auf verbesserte OP-Techniken und neue Intraokularlinsenmaterialien und -designs zurückzuführen.

Hervorgerufen wird der Nachstar durch die postoperative Proliferation und Migration verbliebener Linsenepithelzellen auf der Linsenkapsel (Apple et al. 1992). Der synonym gebrauchte Begriff Kapseltrübung ist insofern keine korrekte Bezeichnung, weil die makroskopisch wahrnehmbare Trübung nicht die Kapsel selbst betrifft, sondern auf die darauf wachsenden Linsenepithelzellen zurückzuführen ist (Ishibashi et al. 1993). Diese Zellen bedecken die innere, vordere Oberfläche des sich um die Linse schmiegenden Kapselsackes und nehmen infolge des Wundreizes durch das Entfernen eines kreisförmigen Vorderkapselsacksegmentes bei der Katarakt-OP in Verbindung mit einer epithelial-mesenchymalen Transformation (Green & McDonnell 1985) veränderte Zelleigenschaften an (Saika et al. 1998). Gelangen zentripetal migrierende äquatoriale Zellen in den Bereich der Sehachse, stören sie den Strahlengang im Auge (Meacock et al 2000), welches für den Patienten eine erneute Verschlechterung des Sehvermögens bedeutet und oft nochmals eine teure und nicht risikolose Laser-chirurgische Therapie erforderlich macht.

Da die Kataraktchirurgie über fünfzig Jahre nach der ersten Implantation einer Intraokularlinse (IOL) durch den britischen Arzt Harold Ridley das häufigste und erfolgreichste chirurgische Verfahren in der Medizin geworden ist, kommt damit auch dem Nachstar eine entsprechend große klinische Relevanz zu (Auffarth 2008).

So wären bei geschätzten 650.000 Linsenextraktionen jährlich in Deutschland und einer Nachstarrate um bis zu 50% mehr als 300.000 Patienten betroffen, in den USA mit rund 2,5 Millionen Katarakt-Operationen pro Jahr über eine Million Menschen

(<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Kataraktchirurgie-und-Intraokularlinsen.8882.0.html>). Daher werden seitens der medizinischen Forschung bereits seit Jahrzehnten intensive Anstrengungen zur Aufklärung der Mechanismen der Nachstarentstehung und für daraus abgeleitete Präventionsmöglichkeiten unternommen.

### **Ansatzpunkt der Arbeit:**

Die Zelladhäsion stellt für epitheliale Zellen die Voraussetzung für das Überleben, die Proliferation, Migration und Produktion von Matrixproteinen dar. Adhäsionsvorgänge sind wie auch viele andere zelluläre Aktivitäten (z.B. Muskelkontraktion, Zellteilung, Sekretion, Motilität)  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse. Zahlreiche Proteine, unter ihnen auch Adhäsionsrezeptoren wie die Integrine sind in ihrer Funktion  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und Kalzium ist zugleich ein bedeutendes intrazelluläres sekundäres Signalmolekül (second messenger). Über Änderungen der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle, die über  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifische Ionenkanäle in der Zellmembran oder per  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung bzw. -Freisetzung durch intrazelluläre Speicher erfolgen können, werden vielfältige Signalwege und Zellreaktionen gesteuert.

Hier setzt die vorliegende Untersuchung an. Ein Eingriff in die Zelladhäsion über die Modulation der Funktion von Adhäsionsrezeptoren ist auf zwei Wegen denkbar. Zum einen ist es möglich, die outside-in-Signalvermittlung von Integrinen extrazellulär zu blockieren. So konnte im Tierversuch durch Verwendung von RGD-Peptiden eine leichte Hemmung der Migration von Linsenepithelzellen auf die hintere Kapselwand erreicht werden (Nishi et al. 1997b). Zum anderen könnte über die Beeinflussung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die intrazelluläre Signaltransduktion, die zur Adhäsionsvermittlung über Adhäsionsmoleküle führt (inside-out signaling), gehemmt werden. An Leukozyten und Leberepithelzellen wurde in vitro ein adhäsionshemmender Effekt des T-Typ Kalziumkanal-Blockers Mibefradil (Clozel et al. 1997; Kobrin et al. 1998) festgestellt, während L-Kanalblocker diese Wirkung in Leukozyten nicht zeigten (Nebe et al. 2002). Mibefradil blockierte in der letztgenannten Arbeit den durch das Chemoattraktans N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-Phenylalanin (FMLP) induzierten Anstieg an freiem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , reduzierte die Expression der  $\beta_2$ -Integrin-Untereinheit auf der Zelloberfläche und beeinträchtigte die Verankerung dieser Integrin-Untereinheit am Zytoskelett. Der Eingriff in die Kalzium-Signaltransduktion von primären humanen Linsenepithelzellen mittels Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle durch den Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil könnte deshalb einen geeigneten Ansatz zur Adhäsionsinhibition darstellen.

## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Nachstar-Entstehung

Der Mechanismus der Nachstarausbildung fußt auf dem besonderen Bau der Augenlinse. Während der Embryonalentwicklung wandeln sich Zellen des hinteren Linsenepithels in primäre Linsenfaser um, so dass nach Abschluß des Linsenaufbaus nur noch die Vorderfläche und der Linsenäquator von Epithel bedeckt sind, während die posteriore Linsenoberfläche zellfrei ist (s. Abb.2.1A,B). In Abhängigkeit von ihrer Lage auf der vorderen Innenseite der Linsenkapsel weisen sie eine unterschiedliche Regenerationsfähigkeit auf. Die äquatorialen Linsenepithelzellen bleiben im Gegensatz zum zentralen anterioren kuboiden Epithel mitotisch aktiv und bilden zeitlebends sekundäre Linsenfaser (Kappelhof & Vrensen 1992; s. Abb.2.1C).

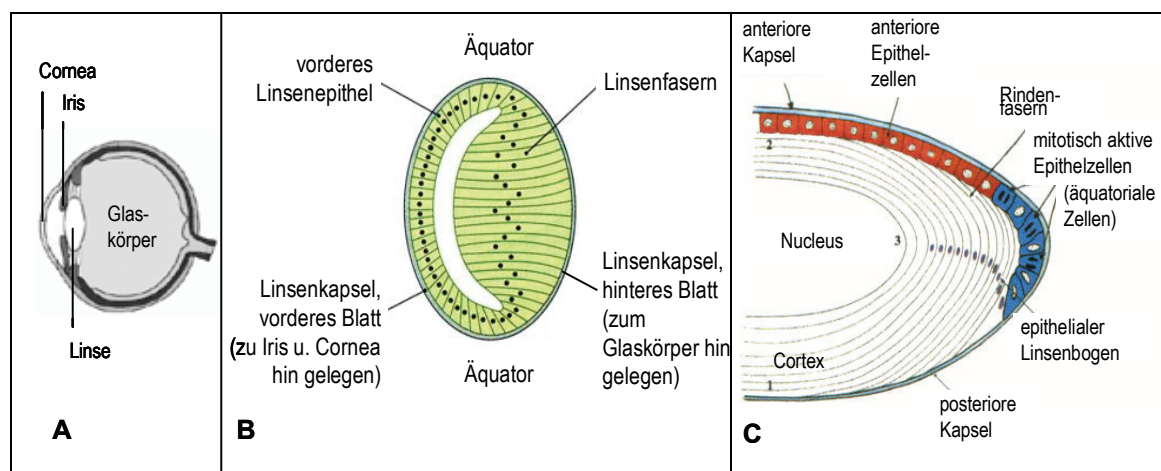


Abb.2.1. Anatomie und Embryologie der Augenlinse. A) schematischer Aufbau des Auges (Längsschnitt, verändert nach Pschyrembel 1994). B) Wachstum der Linse in der Embryonalphase durch Bildung primärer Linsenfaser (aus: Grehn 2006). C) anschließendes appositionelles Linsenwachstum durch Bildung sekundärer Linsenfaser (verändert nach Apple & Rabb 1998; aus Auffarth et al. 2005).

Die Kataraktchirurgie induziert infolge des Wundreizes durch das Entfernen eines kreisförmigen Vorderkapselsacksegmentes eine Wundheilungsreaktion mit Zellproliferation und Ablagerung von Extrazellulärer Matrix (Meacock et al. 2000). Sowohl anteriore als auch äquatoriale Linsenepithelzellen durchlaufen eine epithelial-mesenchymale Transformation (Green & McDonnell 1985; s. Abb.2.2.) und nehmen Myofibroblasten-Eigenschaften (s. Tab.2.1) an (Kappelhof & Vrensen 1992, Saika et al. 1998). Dieser Transformations-Prozess beginnt postoperativ innerhalb weniger Tage (McDonnell et al. 1983, 1985). Die anterioren Linsenepithelzellen zeigen postoperativ eine mäßige Migrationsfähigkeit, dafür aber eine starke Neigung zur Ausbildung  $\alpha$ -smooth muscle actin-enthaltender kontraktile Myofibrillen und Kollagenabscheidung

(Kurosaka et al. 1996, Menapace 2007, Nishi et al 1995, Nishi 1999). Zudem produzieren sie als zusätzliche Matrixproteine Kollagen Typ I-III, VI (Shigemitsu et al. 1999). Diese Eigenschaften führen zu einer ringförmigen Fibrose, Fältelung und weisslichen Trübung der restlichen Vorderkapsel im Fusionsbereich mit der Hinterkapsel bzw. der Optik der implantierten Linse, wo zurückgebliebene Rindenanteile sowie degenerierende und proliferierende Epithelzellen eingeschlossen sind der (fibrotischer Nachstar; Saika et al. 1997, Tetz et al. 1998, Trivedi et al. 2002). Im Gegensatz zu den anterioren Linsenepithelzellen besitzen die äquatorialen Linsenepithelzellen ein ausgeprägtes Proliferations- und Migrationsvermögen in Richtung zentrale Hinterkapsel, wo sie sich zwischen Linsenkapsel und Intraokularlinsen-Optik drängen und z.T. linsenfaserähnliche perlenförmige Blasenzell-Regenerate bilden (regenatorischer Nachstar; Kappelhof & Vrensen 1992, Menapace 2007, Trivedi et al. 2002). Da der vorwiegend durch äquatoriale proliferierende und migrierende Linsenepithelzellen hervorgerufene regeneratorsche Nachstar die Hauptursache für die nachträgliche Visuseinschränkung ist, gilt diesem bei der Prophylaxe das Hauptaugenmerk (Menapace 2007).

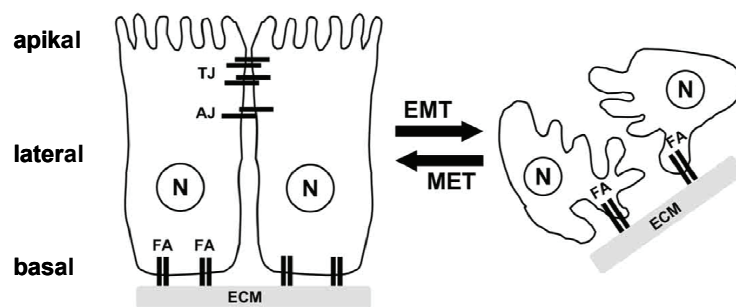


Abb.2.2. Morphologische Charakteristik epithelialer und mesenchymaler Zellen (ergänzt nach Nishimura & Sasaki 2008). Als epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) wird der Verlust epitheltypischer Struktur- und Funktionsmerkmale bei Annahme von Form und Eigenschaften mesenchymaler Zellen (Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen, Zytoskelett-Reorganisation, gesteigerte Motilität, Synthese von extrazellulärer Matrix (Radisky 2005)) bezeichnet. Die mesenchymal-epitheliale Transformation (MET), stellt einen der EMT entgegengesetzten Prozess mit Verlust mesenchymaler Zelleigenschaften unter Ausbildung epithelzelltypischer Merkmale dar. AJ – Adhärenz Junction, ECM – Extrazelluläre Matrix, FA – Fokaladhäsion, N – Nukleus, TJ – Tight Junction.

Die intraoperative Läsion des Linsenepithels führt auch zur lokalen Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, insbesondere am Wundrand (Saika 2004). Entsprechend wurde bisher die Beteiligung verschiedener Zytokine wie z.B. TGF- $\beta$  und bFGF an der Nachstar-Genese belegt (Duncan et al. 1997, Lee & Joo 1999, Wormstone et al. 1997, Yao et al. 2008). Des weiteren ist die Linsenepithelzell-Proliferation „anchorage-dependent“, d.h. für ein mitotisches Wachstum benötigen die Linsenepithelzellen den festen Zellkontakt zum Kapselsack (Iwig et al. 1980).

Tab.2.1. Nachstarbedingte Gewebeveränderungen (auszugsweise entnommen aus Shigemitsu et al. 1999).

	Posteriore Kapselfibrose		Anteriore Kapselfibrose		Anteriore Kapsel <sup>1</sup>	
	Fibrose	Kapsel	Fibrose	Kapsel	LEZ	Kapsel
Anwesenheit von Linsenepithelzellen	±	+	-			±
<b>Wachstumsfaktoren</b>						
Epidermal growth factor (EGF)	+	+	+	-	+	+
EGF-Rezeptor	±	-	±	-	+	-
Fibroblast growth factor (FGF)	+	-	±	-	+	-
FGF-Rezeptor	±	-	±	-	±	-
Transforming growth factor (TGF)-β	+	-	±	-	±	-
TGF- β-Rezeptor Typ II	+	-	+	-	+	-
<b>Zytoskelett-Proteine</b>						
α-smooth muscle actin	+	-	+	-	-	-
Keratin	+	-	±	-	+	-
Vimentin	-	-	-	-	-	-
Myosin	-	-	-	-	-	-
<b>Zelluläre &amp; Extrazelluläre Matrixproteine</b>						
Fibronectin	+	-	+	-	+	-
Laminin	±	±	±	±	+	+
Kollagen Typ I	+	-	±	-	-	-
Kollagen Typ II	-	-	-	-	-	-
Kollagen Typ III	+	+	±	+	-	+
Kollagen Typ IV	+	±	+	±	±	+
Kollagen Typ V	+	±	±	-	-	±
Kollagen Typ VI	+	±	+	±	-	±

<sup>1)</sup> während der Katarakt-Operation entnommenes Material

+ positiv, ± partiell positiv, - negativ

## 2.2 Nachstar-Prävention

Die vielfältigen Präventionsansätze lassen sich in chirurgische, mechanische und pharmakologische Strategien unterscheiden.

Angestrebt wird eine möglichst atraumatische Operation, um intra- und postoperative Entzündungsreaktionen zu minimieren, die aus der Störung der Blut-Kammerwasserschranke resultieren und Zellproliferationen begünstigen können (<http://www.katarakt.net/html/pco.htm>). Maßnahmen dazu sind z.B. eine möglichst kleine Kapsulorhexis und deren Überlappen mit der IOL-Optik, die bestmögliche Entfernung von Rindenmaterial und Linsenepithelzellen durch Hydrodissektion sowie das Verbinden von vorderem und hinterem Kapselblatt (Pandey et al. 2004, Rabsilber & Auffarth 2006).

Weiterhin kann durch das IOL-Material und –design Einfluss auf die Nachstarentwicklung genommen werden. Scharfkantige Intraokularlinsen reduzieren unabhängig vom IOL-Material den Nachstar signifikant, indem an der scharfen Optikkante ein scharfer Kapselknick gebildet und die Migration der Linsenepithelzellen

durch Kontaktinhibition gehemmt wird (Nishi et al. 2007, Übersicht s. Nishi 2005), was erstmals tierexperimentell durch Nishi et al. (1998) nachgewiesen wurde. In Ausweitung des Barriereeffektes nach der „no space no cells“-Theorie erhält die Adhäsivität als Materialeigenschaft eine besondere Bedeutung, da ein enger Kontakt zwischen IOL-Rückfläche und Vorderseite der hinteren Kapsel die Migration von Linsenepithelzellen erschwert (Apple et al. 1992, Apple 2000, Katayama et al. 2007).

Pharmakologische Lösungsansätze waren bisher für die klinische Praxis entweder nicht sicher, effektiv oder praktikabel genug. Beispiele für die Vielfalt der Strategien reichen von Zytostatika, Steroiden, nicht-steroiden Antiphlogistika und Adhäsionsinhibitoren über Heparin, Lidocain, Suramin und Immunotoxinen bis zu Suizidgen-Transfer, Photodynamischer Therapie und osmotisch effektiven Substanzen (Übersicht s. Auffarth et al. 2005, Rabsilber & Auffarth 2006). Die vier möglichen Interventionsansätze entsprechen den vier Stufen der PCO-Entwicklung: 1) Zelladhäsion, 2) Migration, 3) Proliferation und 4) Differenzierung (aus: Bertelmann & Kojetinsky 2001). Aus klinischer Sicht hingegen sind gegenwärtig drei Hauptwege unterscheidbar, auf denen ein Pharmakon zu den Zielzellen gebracht werden kann: 1. direkte Injektion in die Vorderkammer, 2. Modifizierung des Spülmediums und 3. entsprechende (chemische) IOL-Modifizierung. Auch hier tritt das mit jeglicher Medikamentenanwendung verbundene Problem der Toxizität gegenüber anderen Geweben, speziell dem Hornhautendothel und Retinazellen auf. Bislang schien die Arzneimittelapplikation über die IOL die aussichtsreichste Präventionsform darzustellen (Wormstone 2002), jedoch eröffnen die Entwicklung des PerfectCapsule™-Systems zur vakuumabgedichteten selektiven Irrigation des Kapselsacks und fortschreitende Erkenntnisse in Biotechnologie, Immunologie und Gentechnik parallel dazu neue Wege zur Eliminierung der Linsenepithelzellen im Kapselsack (Auffarth et al. 2005).

## **2.3 Zelladhäsion im Linsenepithel**

### **2.3.1 Zellverbindungen**

Epithelien kleiden innere und äußere Oberflächen vielzelliger tierischer Organismen aus und übernehmen vielfältige Aufgaben. Linsenepithelzellen übernehmen in vivo vorrangig den Aufbau und die Versorgung der Augenlinse. Die vorrangige Schutz-, Transport-, und Barrierefunktion des Linsenepithels ergibt sich aus seiner dichten Zellanordnung auf einer Basalmembran. Die Linsenkapsel und das darunter liegende



Linsene­pithel stellen entsprechend eine selektiv permeable Barriere zwischen Linsenfasern und umgebendem Kammerwasser dar (Duncan 1973). Mit ihren Nachbarzellen und mit der Basalmembran sind Linsene­pithelzellen durch charakteristische Zellkontakte fest verbunden (s.Tab.2.2). Die aus dieser Verankerung resultierende Zellpolarität (s. Abb.2.2) ist für ihre Funktion von entscheidender Bedeutung und spiegelt sich in der asymmetrischen Verteilung der Zellorganellen wieder (Alberts et al. 2005).

Tab.2.2. Beispiele für Zellverbindungen in Epithelien (nach Alberts et al. 2005).

Typ	Bezeichnung und Membranlokalisation	Funktion
<b>Undurchlässige Verbindungen</b>	Tight Junction (apikolateral)	Versiegelung benachbarter Zellen in einer Epithelzellschicht zur Verhinderung des extrazellulären Molekültransports durch Epithelien
<b>Haftverbindungen</b>		
• Adhärenzverbindungen für Aktinfilamente	Zell-Zell-Verbindung: Adhäsionsverbindung (Adherens Junction) (lateral) Zell-Matrix-Verbindung: Fokalkontakt (basal)	Verbindung von Aktinbündeln benachbarter Zellen Mechanische Verankerung von Zellen mit dem Substrat (extrazelluläre Matrix)
• Adhärenzverbindungen für Intermediärfilamente	Zell-Zell-Verbindung: Desmosom (Desmosom Junction) (lateral) Zell-Matrix-Verbindung: Hemidesmosom (basal)	Verbindung von Intermediärfilamenten benachbarter Zellen Verankerung von Intermediärfilamenten einer Zelle mit der Basalmembran
<b>Kommunizierende Verbindungen</b>	Gap Junction (Nexus) (lateral)	Durchtritt kleiner wasserlöslicher Moleküle und Ionen ins Zytosol benachbarter Zellen; elektrische Kopplung von Nachbarzellen

## Zell-Zell-Verbindungen

Die Zell-Zell-Adhäsion wird durch funktionell und strukturell sehr unterschiedliche Strukturen vermittelt. So dienen Tight Junctions der Versiegelung von Epithelien, Adhäsionsverbindungen und Desmosomen dem mechanischen Verknüpfen von Nachbarzellen und Gap Junctions der elektrischen und metabolischen Kopplung von Zellen (s.Tab.2.2). Haftkomplexe als Kombinationsabfolge von Tight Junction, Adherens Junction und Desmosom verbinden nicht nur angrenzende Zellen miteinander, sondern stellen gleichzeitig eine physikochemische Barriere dar. Interzelluläre Verbindungen tragen jedoch nicht nur zur strukturellen Zellintegrität bei, sondern sind auch regulierter Bestandteil zellulärer Signaltransduktionsprozesse (Matter & Balda 2007, Irie et al. 2004, Gumbiner 2005, Halbleib & Nelson 2006, Perez-Moreno & Fuchs 2006). Native humane Linsene­pithelzellen besitzen Tight Junctions, Adherent Junctions, Desmosomen und Gap Junctions (Stump et al. 2006, Dewey et al. 1995, Lo 1988).

## Zell-Matrix-Verbindungen

Linsenepithelzellen weisen einen polaren Bau auf (vgl. Schema s. Abb.2.2): die ehemals freie apikale Seite ist nach der Bildung des embryonalen Linsenkerns den Linsenfaserzellen der Augenlinse zugewandt, die basale Seite ruht auf einer zum Kapselsack verdickten Basallamina. Diese grenzt das Linsenepithel gegen das Kammerwasser der vorderen Augenkammer sowie gegen den Glaskörper der Hinterkammer ab. Sie stellt als semipermeable Membran, die für Wasser und Elektrolyte durchlässig ist, sowohl eine Unterlage als auch eine Barriere für die Linsenepithelzellen dar. Die Linsenkapsel besteht vor allem aus Kollagen Typ IV, Laminin und zahlreichen ergänzenden Proteinen, die von den Epithelzellen selbst produziert und in den extrazellulären Raum abgegeben werden (Marcantonio & Vrensen 1999). Laminin bildet Anheftungspunkte für Adhäsionsmoleküle in der Plasmamembran von Epithelzellen und besitzt verknüpfende Funktion ähnlich Fibronectin in Bindegeweben (aus: Karp 2005). In ihrer Gesamtheit bilden diese sezernierten extrazellulären Makromoleküle ein komplexes Netzwerk: die extrazelluläre Matrix (EZM). Im anterioren, während der Katarakt-OP entnommenen Linsenepithel wurden die extrazellulären Matrixproteine Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin nachgewiesen (Shigemitsu et al. 1999, s. Tab.2.1). Fokalkontakte und Hemidesmosomen bewirken die Verankerung von Epithelzellen auf ihrer extrazellulären Matrix (s. Tab.2.2). Proteine der extrazellulären Matrix dienen als Substrat für die Zellverankerung, können aber darüber hinaus auch vielfältige zelluläre Prozesse regulieren.

### 2.3.2 Integrine und Zytoskelettverankerung

Der Kontakt zwischen Zelle und Substrat wird durch spezielle Oberflächenrezeptoren, die Integrine, vermittelt (Alberts et al. 2004, Hynes 1987, 1992). Integrine sind in Fokalkontakten konzentriert. Einerseits verknüpfen diese Transmembranproteine das Aktinzytoskelett mit der Zellmembran, andererseits vermitteln sie Zell-Matrix-Interaktionen (Brakebusch & Fässler 2003; s. Abb.2.3). Die Grundstruktur von Integrinen ist ein Heterodimer-Komplex aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Polypeptidkette (Ruoslahti & Pierschbacher 1987). Derzeit sind 8 verschiedene  $\beta$ - und 18 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten bekannt, die 24 funktionale Kombinationen ergeben und insbesondere spezifische EZM-Proteine als Liganden binden (Calderwood 2004, Hynes 2002, van der Flier & Sonnenberg 2001). Dabei kann ein Integrin mehrere

Matrixproteine als Liganden aufweisen. So bindet beispielsweise  $\alpha 5 \beta 1$  an Fibronectin und  $\alpha \nu \beta 5$  an Vitronectin als entscheidenden Liganden, während  $\alpha 2 \beta 1$  (Kollagen, Laminin) und  $\alpha 3 \beta 1$  (Kollagen, Laminin und Fibronectin) verschiedene primäre Liganden erkennen (Berman et al. 2003, D'Souza et al. 1991). Humane Linsenepithelzellen anteriorer Kapselsegmente exprimieren die Integrin-Untereinheiten  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$  (Nishi et al. 1997a, Zhang et al. 2000).

Die Erkennung des spezifischen Liganden erfolgt durch die  $\beta$ -Untereinheit, welche als kleinstes Strukturelement eine Arginin-Glycin-Asparagin-Aminosäuresequenz (RGD-Peptidsequenz) im EZM-Protein, z.B. Kollagen Typ I und Fibronectin in Fibroblasten, Myofibroblasten und Osteoblasten erkennt (Ruoslahti & Pierschbacher 1987). Integrine können aber auch an bestimmte Nicht-RGD-Sequenzen, z.B. von Kollagen IV und Laminin in Epithelzellen binden (D'Souza et al. 1991). Die EZM-Bindung erfordert  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  in der  $\alpha$ -Untereinheit (Ginsberg et al. 1988, Hemler 1988, Garratt & Humphries 1995). Viele Integrine, darunter alle mit einer  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ -Untereinheit, liegen auf der Zelloberfläche in einer inaktiven Konformation vor, aus der sie durch zelluläre Signale, die eine Konformationsänderung auslösen, aktiviert werden (Williams et al. 1994).

Die zytoplasmatischen Domänen von Integrinen enthalten, da sie keine eigene enzymatische Aktivität besitzen, Bindungsstellen für viele verschiedene zytoplasmatische Proteine, darunter auch Adapterproteine zur Verknüpfung mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts wie Talin und  $\alpha$ -Actinin (s. Abb.2.3; Burridge & Chrzanowska-Wodnicka 1996, Otey & Carpen 2004). Dadurch können u.a. mechanische Kräfte ins Zellinnere übertragen werden (Ingber 2003). Aktinfilamente als essentielle Bestandteile des Zytoskeletts bilden in Epithelzellen ein dichtes dreidimensionales subkortikales Netzwerk unterhalb der Plasmamembran (Lüllmann-Rauch 2006). Auch humane Linsenepithelzellen in situ zeigen diese subkortikale Anordnung der Aktinfilamente (Yeh et al. 1986).

Das Aktingerüst bedingt Form und Stabilität der Zellen, ermöglicht aber auch Organelltransporte und Zellbewegungen (Lüllmann-Rauch 2006). Das Aktin-Zytoskelett vermittelt ein breites Spektrum von Zellfunktionen, indem es den Strukturrahmen bietet, von dem Zellform, Zellmigration, Polarität, Zytokinese, Adhäsionskomplex-Formierung und weitere zelluläre Vorgänge abhängen (Hall 1998, van Aelst et al. 1997). In bestimmten Zellstrukturen wie z.B. Mikrovilli, Adhärenzkontakten und Tight Junctions tritt dieses Netzwerk verstärkt auf. Aufgrund seiner Dynamik und Verankerung an Zellmembranrezeptoren ist Aktin in der Lage, Zellantworten auf extrazelluläre Signale zu vermitteln und ist damit aktiv in die Signaltransduktion eingebunden (Hall & Nobes 2000, van Aelst et al. 1997, Kaibuchi et al. 1999, Ridley 2001, Etienne-Manneville &

Hall 2002). Das Aktingerüst unterliegt einem ständigen Umbau durch Selbstassoziation, Polymerisation sowie Dissoziation und Depolymerisation. Zahlreiche Aktin-bindende Proteine beeinflussen seine Dynamik, Organisation und Verbindung mit der Zellmembran. So stabilisieren  $\alpha$ -Actinin, Filamin und Fimbrin durch ihre quervernetzende Wirkung die Aktinfilamente, während Profilin, Gelsolin und Villin Aktinmonomere binden oder Aktinfilamente fragmentieren (Petrides & Löffler 1998). Auch viele Transmembranproteine (u.a. Ionenkanäle wie  $K^+$ - und  $Cl^-$  Kanäle, epitheliale  $Na^+$ -Kanäle, Pumpen wie die  $Na^+/K^+$ -ATPase und  $Na^+/H^+$ -Austauscher, Rezeptoren, Zelladhäsionsproteine) bzw. funktionell zusammengehörige Proteine werden am kortikalen Aktinnetzwerk verankert und so an ihrem Platz bzw. in räumlicher Nähe gehalten (Mays et al. 1994, Ehrhardt et al. 1996, Jing et al. 1997, Smith et al. 1991, Zuckerman et al. 1999, Schwartz et al. 1997, Devarajan et al. 1994, Ediger et al. 1999).

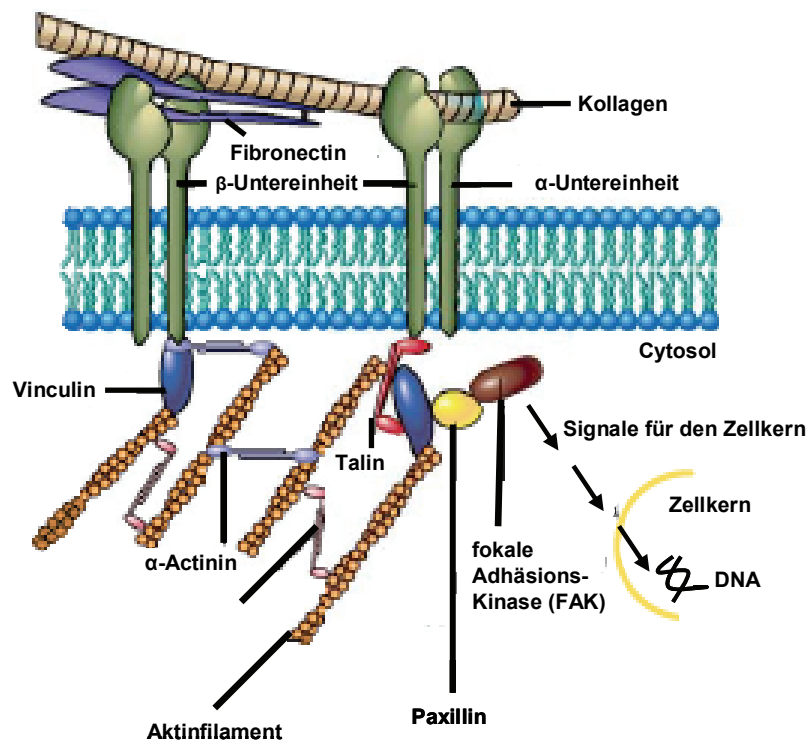


Abb.2.3. Schematische Darstellung eines Fokalkontakts mit den Wechselwirkungen der Integrinmoleküle mit extra- und intrazellulären Proteinen (aus Karp 2005). Bindung extrazellulärer Liganden (z.B. Kollagen, Fibronectin) bewirkt über Konformationsänderungen die Verknüpfung mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Die durch Aktin-bindende Proteine (z.B. Talin,  $\alpha$ -Actinin) realisierten Integrin-Aktin-Verknüpfungen führen wiederum zur Integrin-Anhäufung auf der Zelloberfläche. Die zyttoplasmatischen Domänen von Integrinen sind auch mit Proteinkinasen wie der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) assoziiert. Durch die Integrin-Ligand-Bindung werden diese Proteinkinasen aktiviert und Signalkaskaden ausgelöst. Zugkräfte, die durch die Verbindung von Myosinmolekülen mit Aktinfilamenten entstehen, werden an Stellen übertragen, an denen die Zelle an ihrer Unterlage festhaftet und ermöglichen Zelladhäsion, Migration und Remodellierung der extrazellulären Matrix.

Desweiteren können auch Nicht-Muskel-Zellen unter bestimmten Konditionen kontraktile Aktomyosinstrukturen (Aktin-Stressfasern) ausbilden, die Motilität und Kontraktilität ermöglichen (Pellegrin & Mellor 2007). Aktinstressfasern sind in nativen Linsenepithelzellen nicht vorhanden, dafür aber in postoperativ transformierten Linsenepithelzellen anzutreffen (Shigemitsu et al. 1999).

### 2.3.3 Einfluss der Integrin-vermittelten Zelladhäsion auf zelluläre Prozesse

Zusätzlich zu ihren strukturellen Funktionen agieren Integrine auch als Sensor (outside-in signaling) oder Effektor (inside-out signaling) in der Signaltransduktion (Hynes 1992, Cary et al. 1999). Die Integrin-vermittelte Zellanheftung an die extrazelluläre Matrix wirkt als Zellzyklus-Regulator und Integrin-assoziierte Proteine sind in zentrale Signaltransduktionswege hinsichtlich Wachstum, Differenzierung und Zellteilung adhärenter Zellen einbezogen (Assoian & Klein 2008, Hehlhans et al. 2007; s. Abb.2.4). Integrine erfüllen Biosensorfunktion und vermitteln Signalereignisse, die Einfluss auf das Überleben von Zellen, die Zellproliferation, die Differenzierung und die Motilität nehmen (Danen 2005, Lock et al. 2008, Stupack 2007, Zutter 2007). Während Integrine, die an Substrat-immobilisierte Liganden binden, typischerweise positive Signale in die Zelle transduzieren, fördern unligierte oder blockierte Integrine im allgemeinen negatives Signaling in die Zelle. Ligandenbindung an die extrazelluläre Integrindomäne induziert Konformationsänderungen und Integrin-Clusterung zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden (z.B. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)/ extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK)-Wege) bzw. Rekrutierung von Multiproteinkomplexen zu Fokaladhäsionen (positives outside-in Signaling; Hynes 2002, Shimaoka et al. 2002). Anschließend übertragen Integrine, denen eine Kinase-Aktivität fehlt, Signale durch eine Vielzahl intrazellulärer Proteinkinasen und Adaptormoleküle wie z.B. die Integrin-linked Kinase (ILK), Fokale Adhäsionskinase (FAK), Talin, Paxillin und GTPasen der Rho-Familie (Hannigan et al. 1996, Schaller et al. 2001, Rosales et al. 1995, Schaller & Parsons 1994, Welsh & Assoian 2000). Umgekehrt erfolgt z.B. die Formgebung und Strukturierung extrazellulärer Matrix über die Integrinkontakte (inside-out). Negatives Signaling resultiert dagegen in Zellzyklusarrest oder Apoptose (Stupack 2007). Für "anchorage-dependent" wachsende Zellen wie Epithelzellen wurde speziell für eine durch Verlust der Zell-Matrix-Adhäsion hervorgerufene Zelltodform der Begriff Anoikis geprägt (Frisch & Ruoslahti 1997, Frisch & Screaton 2001). Aufgrund der Vermittlerrolle der Integrine bei der Etablierung von Fokalkontakten als Kreuzungsstelle überlebenswichtiger Signalwege stellt die Beeinflussung der Integrin-vermittelten Zelladhäsion einen

geeigneten Ansatz zur Vermeidung bzw. Unterdrückung pathologischer Zellproliferationen dar.

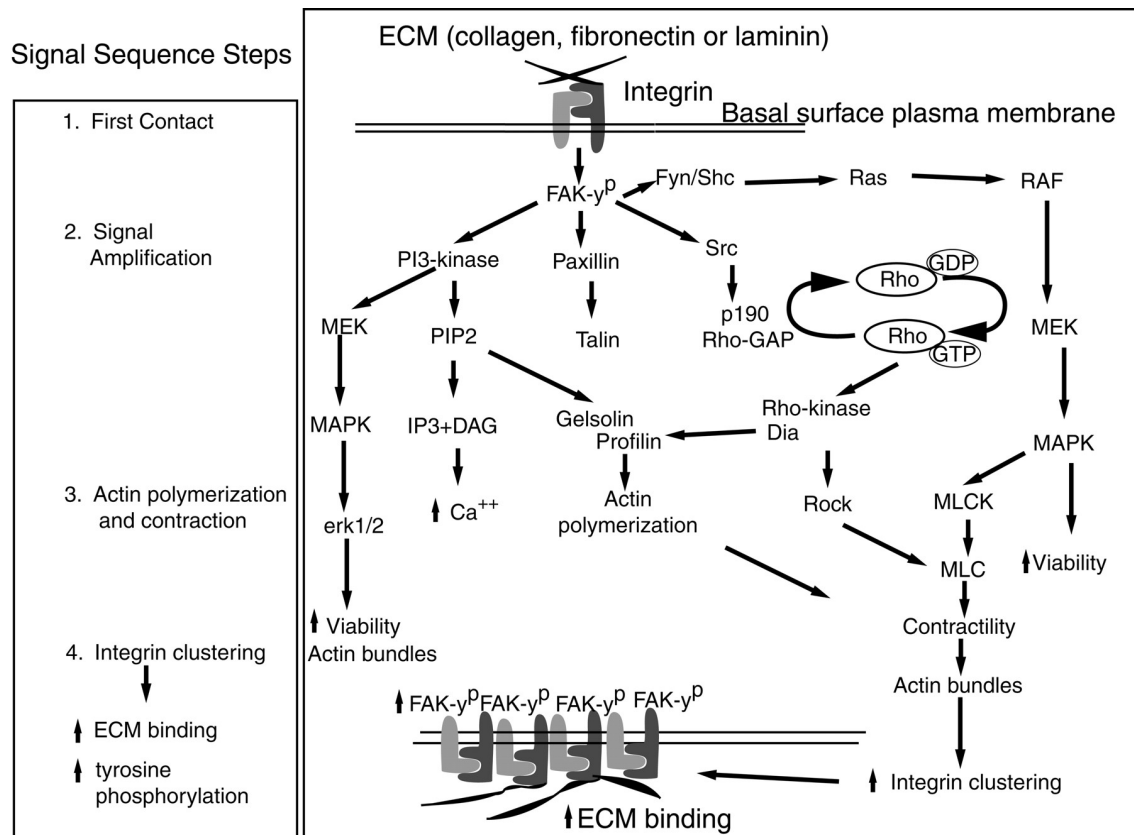


Abb.2.4. Schematische Darstellung der Signaltransduktion über Integrin-Zellrezeptoren in Epithelien (aus: Chu et al. 2000). Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion mit der extrazellulären Matrix (ECM) wird in diesem Modell hypothetisch in 4 Stadien eingeteilt: 1) Erstkontakt (ECM-Bindung und FAK-Phosphorylierung), 2) Signalverstärkung (Phosphorylierung assoziierter Kinasen und Proteine durch FAK, z.B. PI-3 Kinase, Paxillin, Fyn/Shc, Src). Diese Proteine verstärken weiter durch Stimulierung ihrer Zielproteine, was zu, 3) verstärkter Aktinpolymerisation und Kontraktion führt (outside-in signaling). Die Aktinzytoskelettorganisation bewirkt wiederum 4) verstärkte Integrin-Anhäufung, resultierend in verstärkter ECM-Bindung und weiterer Signalamplifikation durch Tyrosinphosphorylierung (inside-out signaling). Die Aktivierung verschiedener hier skizzierter Adhäsions-induzierter Signalwege wie z.B. des MAP-Kinase-Weges fördert die Lebensfähigkeit von Zellen.

## 2.4 Bedeutung von Kalzium für zelluläre Prozesse

### 2.4.1 Kalzium-Haushalt

Kalzium vermag als universeller intrazellulärer Botenstoff zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Genexpression, Sekretion, Proliferation, Differenzierung und Apoptose zu regulieren (Berridge et al. 1998, Lang et al. 2000, Schreiber 2005). Die meisten dieser Effekte werden durch repetitive kurzzeitige Anstiege der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermittelt, deren Frequenz und Amplitude von Art und Dauer des extra- oder intrazellulären Stimulus abhängt (s. Abb.2.5). Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentration wird durch Proteine kontrolliert, die in der Plasmamembran (Santella et al. 2004, Berridge et al. 2003, Carafoli et al. 2001, Carafoli & Brini 2000) und in den Membranen cytoplasmatischer Organellen (Gerasimenko & Gerasimenko 2004, Bianchi et al. 2004, Berridge 2002, Churchill et al. 2002, Pinton et al. 1998) lokalisiert sind.

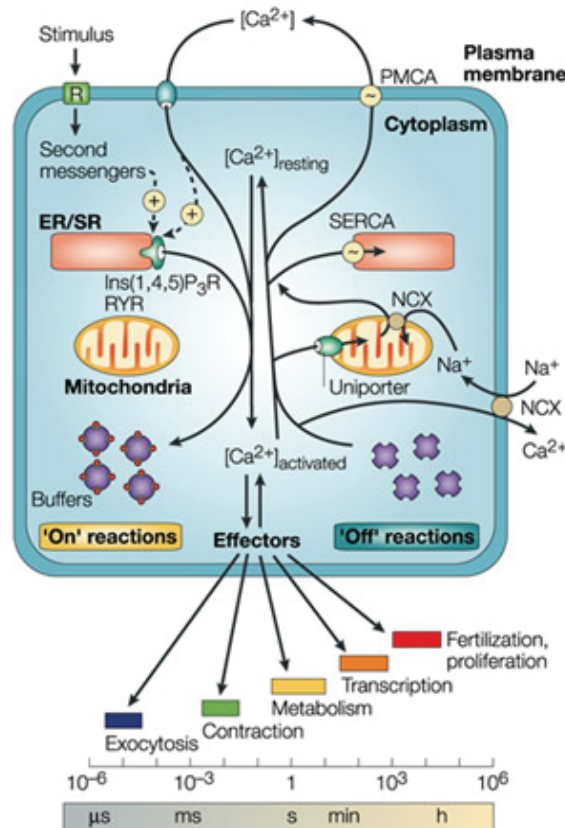


Abb.2.5. Schematische Darstellung grundlegender Komponenten des Kalzium Signalings (aus Berridge et al. 2003). Stimuli induzieren den Eintritt von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> und die Bildung sekundärer Botenstoffe, die zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem Sarko-/Endoplasmatischen Retikulum (ER) führen. Der größte Teil dieses freien Ca<sup>2+</sup> wird an Puffer gebunden, während eine geringe Menge an Effektoren bindet, die verschiedene Zellprozesse, die innerhalb eines breiten Zeitspektrums ablaufen, aktivieren ('On'-reactions). Im Zuge von 'Off'-Reaktionen verlässt Ca<sup>2+</sup> die Effektoren und Puffer wieder und wird aus dem Zytoplasma durch verschiedene Ionenaustauscher und Pumpen entfernt. Während der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) und die Plasmamembran-Ca<sup>2+</sup>-ATPase Ca<sup>2+</sup> (PMCA) aus der Zelle in den Extrazellularraum befördern, pumpt die sarko-/endoplasmatische Retikulum-Ca<sup>2+</sup>-ATPase Ca<sup>2+</sup> zurück in das ER. Mitochondrien haben ebenfalls eine aktive Funktion während der Erholungsphase zur Wiederherstellung der zellulären Ruhe-Ca<sup>2+</sup>-Konzentration inne, denn sie separieren Ca<sup>2+</sup> unmittelbar durch einen Uniporter und entlassen dieses Ca<sup>2+</sup> dann langsamer zurück ins Zytosol, von wo es durch SERCA und PMCA extrudiert wird. Das Überleben von Zellen hängt von der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase ab, wobei die Ca<sup>2+</sup>-Bewegungen der 'Off'-Reaktionen exakt denjenigen der 'On'-Reaktionen entsprechen. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>R – Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor; RYR – Ryanodin-Rezeptor.

Diese Signalwirkung von Kalzium wird durch seinen koordinierten Transmembrantransport zwischen verschiedenen Zellkompartimenten (Zytosol, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Nukleus) ermöglicht, die sehr unterschiedliche Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen aufweisen und eine spezifische Rolle sowohl

beim physiologischen als auch pathologischen  $\text{Ca}^{2+}$ - Signaling spielen (Petersen et al. 1994, Berridge et al. 2003, Carafoli 2004, Verkhratsky 2005). Die Kalzium-Bewegungen zwischen den Kompartimenten werden von einer begrenzten Zahl von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und Transportern regiert. Die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol einer unstimulierten Zelle ist extrem niedrig ( $\sim 0,1 \mu\text{M}$ ), verglichen mit seiner Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit ( $\sim 1\text{-}2 \text{ mM}$ ) und im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums ( $\sim 0,2 - 1 \text{ mM}$ ). Zwischen Mitochondrienmatrix und Zytosol besteht zusätzlich zum Konzentrationsgefälle (mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $\sim 0,1 \mu\text{M} - 0,01 \text{ mM}$ ) ein elektrischer Gradient bis zu  $200 \text{ mV}$  als Triebkraft für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (Carafoli 2005, Karp 2005).

Ein Anstieg der Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol wird durch vielfältige Signale, wie z. B. Membrandepolarisation, Zell-stretching, Zellgifte, extrazelluläre Agonisten und intrazelluläre Botenstoffe ausgelöst (Berridge et al. 2003). Öffnet ein solches Signal vorübergehend  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Zellmembran oder der Membran des als intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher geltenden Endoplasmatischen Retikulums (ER), strömt  $\text{Ca}^{2+}$  in Richtung seines elektrochemischen Gradienten ins Zytosol und verändert die Aktivität vieler  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteine im Zytosol.  $\text{Ca}^{2+}$  wirkt dabei hauptsächlich indirekt über die Wechselwirkung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen.  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine repräsentieren das zweite wichtige Element, welches den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport innerhalb der erwähnten Zellorganellen steuert. Am verbreitetsten ist Calmodulin, welches nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung eine Konformationsänderung erfährt, die es ihm ermöglicht, sich um eine große Zahl von Zielproteinen in der Zelle zu wickeln und dadurch deren Aktivität zu verändern. Zu den Calmodulin-regulierten Proteinen gehören z.B. Ionenkanäle, Kinasen und Phosphatasen wie die für die Zellzyklusmaschinerie wichtige  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängige (CaM)-Kinase II (CaMK II) und wie die CaM-abhängige Phosphatase Calcineurin.

#### 2.4.2 Kalzium und Zellproliferation

Der Zellteilungszyklus wird durch die Umweltbedingungen reguliert (Nährstoffangebot, Hormone, Wachstumsfaktoren u.a.) und durch interne Kontrollpunkte koordiniert (Nurse 2002, Vermeulen et al. 2003). Extrazelluläre Informationen müssen durch Signaltransduktion auf die Zellzykluselemente übertragen werden. Kernelemente der Zellzyklusmaschinerie sind die Cyklin-abhängigen Protein-Kinasen (CDKs; Pines & Hunter 1991, Murray 2004). Kalzium, welches alle wichtigen Lebensvorgänge eukaryotischer Zellen kontrolliert, erweist sich auch hier als bedeutender Regulator



(Lipskaja & Lompré 2004, Whitaker 2006). Der Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  scheint dabei auf die Kontrolle von Zellwachstum und Zellteilung größeren Einfluss auszuüben als aus intrazellulären Speichern freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  (Moccia et al. 2003, Munaron et al. 2004, Jaggar & Nelson 2000, Legrand et al. 2001). So ermöglichte die Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx die Kontrolle der Proliferation von Endothelzellen (Munaron et al. 2004, Antoniotti et al. 2003). L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen wurde eine signifikante Rolle in Aktivierungs- und Proliferationsprozessen von T-Lymphozyten in vitro und in vivo nachgewiesen (Kotturi et al. 2003). Die Expression von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen wurde mit normaler und pathologischer Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen assoziiert, wobei deren Expression mit der G1 und S Phase des Zellzyklus verbunden war (Cribbs 2006).

Wie für die Signalfunktionen von  $\text{Ca}^{2+}$  charakteristisch, wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Botschaft an den Zellzyklus vorwiegend durch das kleine  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Calmodulin (CaM) dekodiert (Carafoli et al. 2001). Unter den beteiligten Signalwegen haben sich besonders zwei Wege, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg und der Ras-Weg als zentrale Regulatoren des eukaryotischen Zellzyklus erwiesen (Cook & Lockyer 2006).  $G_1$  ist die sensibelste Zellzyklusphase gegenüber einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Absenkung (Kahl & Means 2003). Ruhende,  $G_0$ -arretierte Zellen benötigen nach Restimulierung durch geeignete Wachstumsfaktoren  $\text{Ca}^{2+}$  früh am Übergang  $G_0/G_1$ , aber auch später in  $G_1$  nahe der  $G_1/S$ -Schnittstelle (Kahl & Means 2003; s. Abb.2.6.). Des weiteren ist  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  in den  $G_2/M$ -Übergang, die Progression der M-Phase und den Austritt aus der Mitose involviert (Santella et al. 2005). Zelltransformation durch DNA-Tumoviren und/oder Onkogene wie Ras kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Erfordernis in  $G_1$  umgehen oder reduzieren (Kahl & Means 2003).

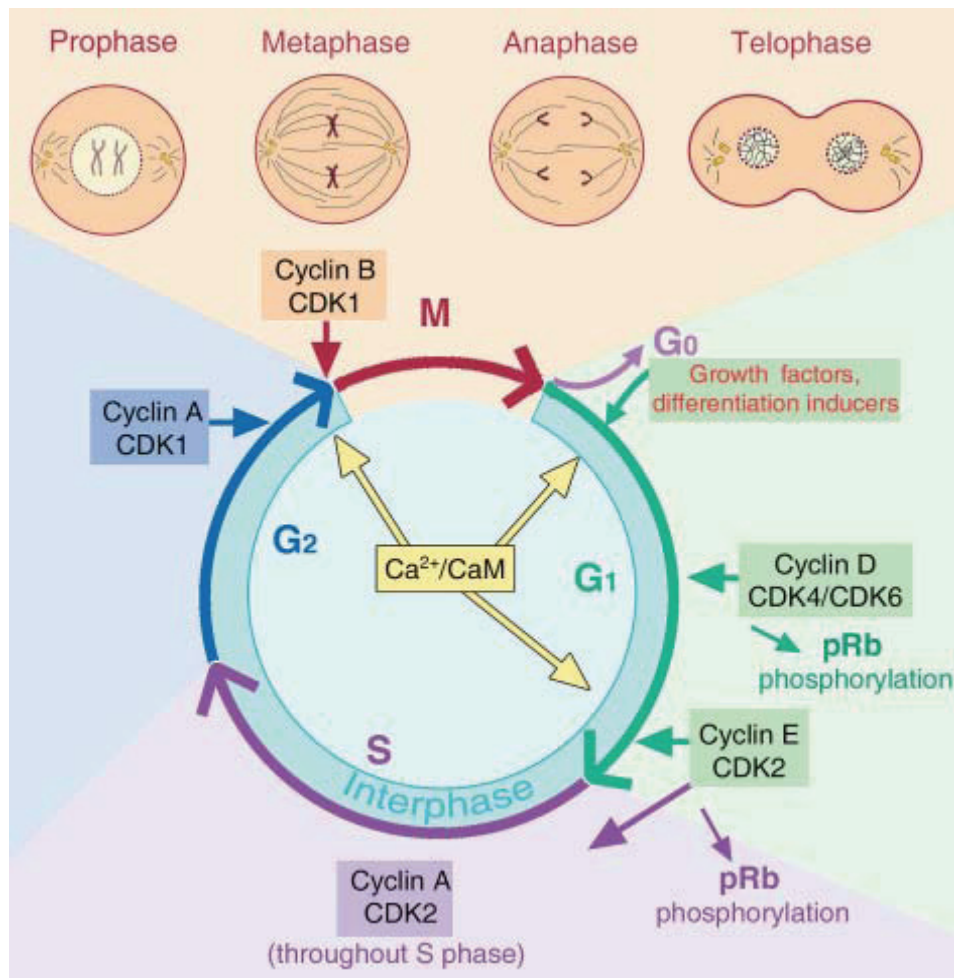


Abb.2.6. Phasen des Zellzyklus in Säugerzellen (aus: Santella et al. 2005). – Das Zellwachstum erfolgt während der Interphase, die G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub> umfasst. Die M-Phase (Mitose) beinhaltet: (1) Prophase, in der die Chromosomen kondensieren und die Zentrosomen die Formierung der Mitosespindeln durch Migration zu entgegengesetzten Polen des Nukleus initiieren. (2) Metaphase, in der sich die Chromosomen im Zentrum der Spindelapparates anordnen. (3) Anaphase, in der sich die Schwesterchromatiden voneinander trennen und zu den entgegengesetzten Polen bewegen. (4) Telophase, während der sich die Kernhülle reassembliert und die Chromosomen decondensieren. Die Zellzyklusübergänge werden durch eine Reihe von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) reguliert. Während der G<sub>1</sub>-Progression werden Cyclin D/CDK4 und CDK6-Komplexe und Cyclin E/CDK2 aktiviert und phosphorylieren das Retinoblastomprotein (pRb). Wenn die Zellen in die S-Phase eintreten, wird Cyclin A/CDK2 aktiviert und bleibt während der gesamten G<sub>2</sub>-Phase aktiviert. Der Übergang von G<sub>2</sub> zu M wird durch Cyclin B/CDK1 reguliert. Ca<sup>2+</sup>/CaM sind früh nach mitogener Stimulierung erforderlich, und später nahe der Grenze G<sub>1</sub>/S. Weiterhin ist Ca<sup>2+</sup>/CaM in die G<sub>2</sub>/M-Transition, die M-Phasen-Progression und in den Ausstieg aus der Mitose involviert.

### 2.4.3 Kalzium und Zelltod

Entwicklung und Erhalt von Geweben und Organen in vielzelligen Organismen verlangen eine kontrollierte Balance zwischen Zellproliferation und Zellverlust. Aus der universellen Vermittlerrolle von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in der zellulären Signaltransduktion ergibt sich die Notwendigkeit der strikten Überwachung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Verteilung zur

Gewährleistung seiner Signalfunktion. Störungen dieses empfindlichen Gleichgewichts, seiner Kontrollmechanismen und von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegen, etwa durch genetische Aberrationen, Medikamentenwirkung oder Umwelteinflüsse, haben nachhaltige Konsequenzen für Zellfunktionen zur Folge und sind die Basis für viele pathologische Veränderungen (Kass & Orrenius 1999). Pathologische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aktivieren verschiedene intrazelluläre Enzymkaskaden, die wiederum Zelltodwege fördern oder ausführen (s. Abb.2.7). Eine dauerhafte Anhebung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration z.B. hat schädlichen Einfluss auf das Überleben von Zellen und führt zum Zelltod (Kass et al. 1992, Orrenius & Nicotera 1994). Abhängig von Zelltyp, Ausmaß des pathologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings oder dem Zellstatus können dieselben Kaskaden entweder apoptotischen oder nekrotischen Zelltod initiieren (Orrenius et al. 2003). So ist Kalzium ein Hauptregulator nicht nur des Überlebens von Zellen, sondern auch des Zelltods als Antwort auf eine Vielzahl zellulärer Signale (Berridge et al. 1998, Giacomello et al. 2007, Sapora & Di Carlo 2006), wobei sich die Zelle für dessen Ausführung derselben Signalsysteme bedient, die auch unter physiologischen Bedingungen für die normale Zellfunktion verantwortlich sind (Nicotera et al. 2007). Die pro-apoptotischen Effekte von  $\text{Ca}^{2+}$  werden durch  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Proteine (u.a.  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Proteasen, Calcineurin, Endonukleasen, Phospholipasen) vermittelt, die auf verschiedene Zellorganellen (Endoplasmatisches Retikulum, Zytoplasma, Mitochondrien) verteilt sind und den Zusammenbruch zahlreicher Zellstrukturen kontrollieren (Orrenius 2004, Bernardi & Rasola 2007, Giorgi et al. 2008, Jeong & Seol 2008).

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, erfolgt unter physiologischen Bedingungen als komplexe, aktive, genetisch programmierte Zellreaktion auf das Ausbleiben von Wachstums- und Überlebensfaktoren, definierte Todessignale oder DNA-Schäden. Als Haupteffektoren apoptotischer Signale fungieren spezielle Proteasen, Caspasen genannt. Initiator-Caspasen (z.B. Caspase-8) aktivieren dabei Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3, -6, -7). Diese wiederum exekutieren apoptotische Zelle durch Spaltung spezifischer Substrate wie u.a. Zytoskelettkomponenten, Zytokine, DNA-Reparaturenzyme und Zellzyklusproteine (Fischer et al. 2003).

Je nach Art des Auslösers werden unterschiedliche Signalwege in den Zellen aktiviert, entweder über die Aktivierung von Todesrezeptoren direkt in der Zellmembran oder über die Modulation der aktuellen Signaltransduktion. Eine unumkehrbare Entscheidung über das Beschreiten des Apoptoseweges wird z.B. auf Mitochondrienebene mit der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran getroffen. Dieses Ereignis setzt als "point of no return" (Chipuk et al. 2006) die Apoptose-Kaskade in zahlreichen intrinsischen Zelltod-Wegen in Gang, indem u.a. das

proapoptotische Bcl-2-Protein Bax an die äußere Mitochondrienmembran transloziert (Eskes et al. 2000), hier Lipid-Poren formt und die Membran durchlässig macht, was den Austritt von Zytocrom c ermöglicht. Im Normalzustand dagegen ist Bax als inaktives Monomer im Zytosol lokalisiert (Hsu & Youle 1998). Nach Apoptose-Induktion ist eine Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern möglich (Gajkowska et al. 2001, Gajkowska et al. 2004).

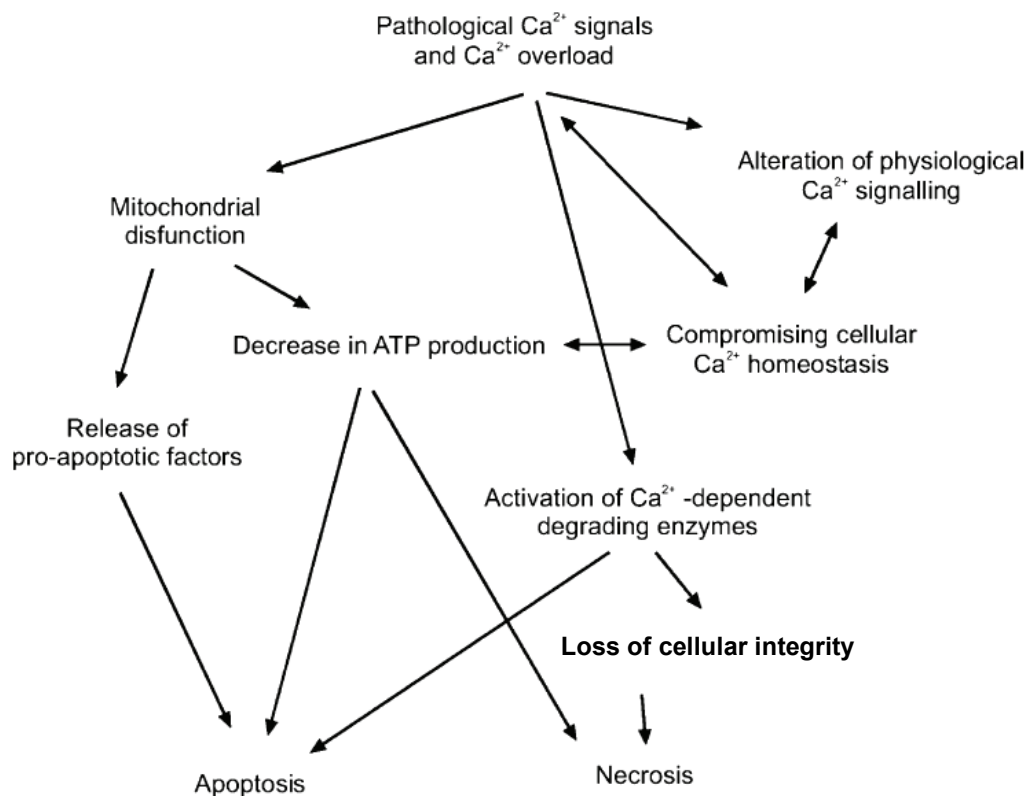


Abb.2.7. Pathologisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling reguliert den Zelltod via Apoptose oder Nekrose (aus Verkhratsky 2007).

Der zelluläre Selbstmord wird durch eine intrazelluläre Proteolysekaskade vermittelt. In ihrem Verlauf kommt es zur Kondensation der Nuklei und internukleosomalen DNA-Degradation. Die Zellen schrumpfen und verdichten sich und zeigen auf ihrer Membranoberfläche charakteristische Erkennungsmoleküle wie z.B. Phosphatidylserin, die es Phagozyten erlauben, diese Zellen aufzunehmen, so dass Entzündungsreaktionen im Unterschied zur Nekrose vermieden werden (Criddle et al. 2007, Mattson & Chan 2003). Bei Nekrose als weiterer Form des Zelltods kommt es infolge akuter Verletzungen zu Zellmembranschäden mit Zellschwellung, Freisetzung des Zellinhalts und anschließender Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe (Criddle et al. 2007, Henriquez et al. 2008). Beide Zelltodformen lassen sich so

aufgrund charakteristischer gegensätzlicher morphologischer Veränderungen unterscheiden.

Anoikis schließlich als spezielle, durch Verlust des Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Kontaktes in adhärent wachsenden Zellen induzierte Form der Apoptose (Frisch & Ruoslahti 1997, Frisch & Screaton 2001) resultiert aus einem inadäquaten Integrin-Signaling, welches Konsequenzen für die damit verknüpften Signalwege, u.a. auch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling nach sich zieht.

## **2.5 Kalziumkanäle und Kalziumkanal-Antagonisten**

### **2.5.1 Kalziumkanäle**

Zellproliferation und Apoptose werden, da beide mit Volumenänderungen verbunden, von veränderter Ionenkanalregulation begleitet (Lang et al. 2005). Das Umschalten zwischen Proliferation und Apoptose hängt u.a. vom Ausmaß und zeitlicher Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritts und vom funktionalen Status der Zelle ab. Aufgrund komplexer Interaktionen mit weiteren Signalwegen kann so ein gegebener Ionenkanal eine duale Rolle in Proliferation und Apoptose spielen. Spezifische Ionenkanalblocker können beide fundamentalen Zellmechanismen ausser Kraft setzen, abhängig von Zelltyp, Umweltbedingungen und Zellkondition.

Die Signalwirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  wird von einer Erhöhung seiner intrazellulären Konzentration vermittelt. Für einen solchen Anstieg stehen zwei Wege zur Verfügung. Erstens können extrazellulär vorhandene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über geeignete Ionenkanäle in die Zelle gelangen, zweitens können bereits in intrazellulären Kompartimenten gespeicherte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins Zytosol freigesetzt werden (s. Abb.2.8).

Da die Plasmamembran für Ladungsträger wie  $\text{Ca}^{2+}$  undurchlässig ist, erfolgt dessen Influx über  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle, die nach ihrem Regulationsmechanismus in mehrere Hauptklassen gruppierbar sind: spannungs-, speicher- und ligandengesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, nicht-selektive  $\text{Ca}^{2+}$ -durchlässige Kanäle sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Membranrezeptoren, die Inositol-(1,4,5)-triphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) als second messenger freisetzen (Bezprozvanny 2005, Carafoli 2005, Galione & Ruas 2005, Hamilton 2005). Spannungsabhängige Kanäle öffnen und schließen sich in Reaktion auf Membranpotentialänderungen über die Plasmamembran (Tsien & Wheeler 1999). Die zweite Familie von Plasmamembran- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen umfasst Liganden-gesteuerte Kanäle. Metabotrope Rezeptoren wie z.B. Glutamaterezeptoren binden Neurotransmitter als Liganden und sind mit G-Proteinen gekoppelt.

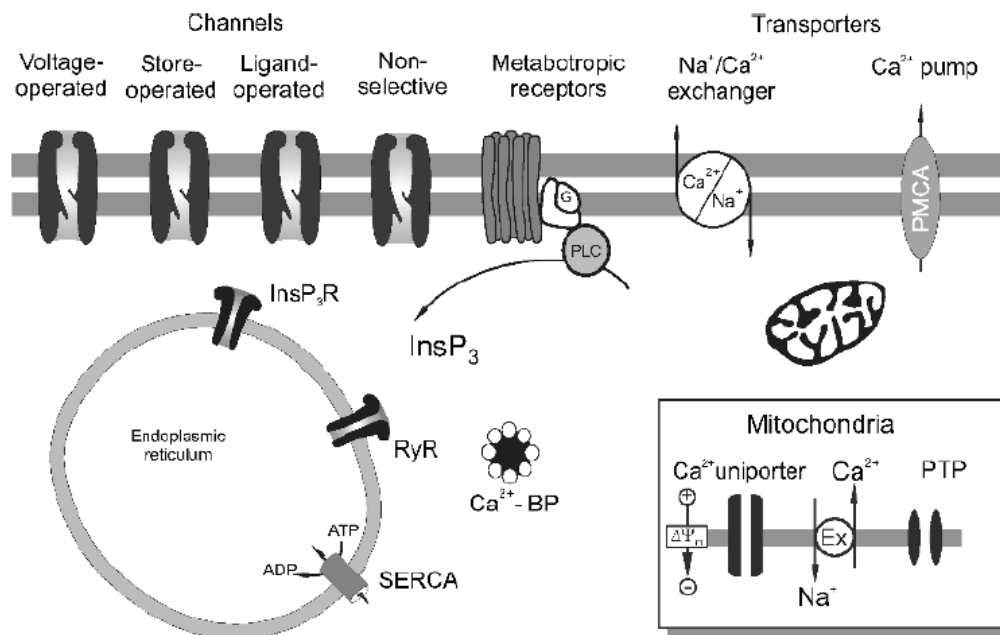


Abb.2.8. Schematische Darstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmechanismen durch zelluläre Membranen (aus Verkhratsky 2007).

G-Proteine können die Phospholipase C aktivieren, welche dann die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositoltriphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) katalysiert. Beide Produkte,  $\text{InsP}_3$  und DAG sind bedeutende intrazelluläre second messenger.  $\text{InsP}_3$  aktiviert z.B.  $\text{InsP}_3$ -Rezeptoren in der ER-Membran, deren Öffnen  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER freisetzt. Ryanodinrezeptoren (RyR) als  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle entlassen nach Aktivierung ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und amplifizieren dadurch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Sie sind modulierbar durch  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP und akzessorische Proteine wie z.B. Calmodulin. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern (ER, Mitochondrien) wird darüber hinaus auch durch  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, permeability transition pores (PTP) und Uniporter (Kirichok et al. 2004) ermöglicht. Die Speicher-Entleerung wiederum aktiviert eine weitere Klasse von Kanälen in der Plasmamembran, die sensitiv sind für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherfüllstand (Putney & McKay 1999, Putney 2001, Parekh & Putney 2005). Auch diese sind Liganden-gesteuert, werden aber konventionell als separate Familie der capacitative calcium entry channels (CCE) bzw. store-operated channels (SOC) bezeichnet. Diese sind homolog zu den transient receptor potential channels (TRP), einer Familie nicht-selektiver Kationenkanäle (Venkatachalam & Montell 2007). Den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport entgegen dessen Gradienten übernehmen dagegen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen wie die Sarco/endoplasmatische Retikulum-ATPase (SERCA) und Plasmamembran-  $\text{Ca}^{2+}$ -

ATPase (PMCA; Wuytack et al. 2002, Guerini et al. 2005, Vangheluwe et al. 2005). Zytoplasmatische hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine fungieren als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (BP, s. Abb.2.8) und bestimmen zum großen Teil die Form der resultierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Lewit-Bentley & Réty 2000, Ikura et al. 2002).

Da diese Arbeit die Auswirkungen einer Blockade des spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Zelle untersucht, sollen im folgenden Abschnitt die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vorgestellt werden.

## 2.5.2 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

Spannungsabhängige Kalziumkanäle sind an der Regulation der zellulären Erregbarkeit und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings beteiligte Transmembranproteine (Huang et al. 2004). Sie sind deshalb charakteristisch für die Plasmamembran elektrisch erregbarer Zellen wie Herzmuskelzellen und Neuronen und werden nach ihrer Charakteristik (Spannungs- und Zeitabhängigkeit, Einzelkanal-Leitfähigkeit, Pharmakologie und Inhibitorsensitivität) weiter in verschiedene Subtypen unterteilt (s. Tab.2.3).

Tab.2.3. Vorkommen und Typen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (teilweise entnommen aus Lacinová 2005).

Nomenklatur <sup>1</sup>		strukturelle Nomenklatur <sup>2</sup>	Vorkommen
HVA	L-Typ	$\text{Ca}_v1.1$	Skelettmuskulatur, glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Nervenzellen
		$\text{Ca}_v1.2$	
		$\text{Ca}_v1.3$	
		$\text{Ca}_v1.4$	
	P/Q-Typ	$\text{Ca}_v2.1$	Nervenzellen
	N-Typ	$\text{Ca}_v2.2$	Nervenzellen
	R-Typ	$\text{Ca}_v2.3$	Nervenzellen
LVA	T-Typ	$\text{Ca}_v3.1$	Herzmuskelzellen, glatte Muskelzellen, Nervenzellen, endokrine Zellen (z.B. Glomerulosazellen der Nebennierenrinde)
		$\text{Ca}_v3.2$	
		$\text{Ca}_v3.3$	

<sup>1</sup> nach Tsien et al. 1988; <sup>2</sup> nach Ertel et al. 2000

Gegenwärtig sind L- („long-lasting“), N- (neuronal), P- („high density in purkinje cells“)/Q-, R- (resistant) und T-Typ (transient)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bekannt (Komuro & Rakic 1992, Llinás et al. 1992, Randall et Tsien 1995). Gemeinsam ist ihnen eine Tetramerstruktur aus  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ - $\delta$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheiten (Catterall & Curtis 1987, Catterall et al. 2003, 2005, Glossmann & Striessnig 1990; s. Abb.2.9). Die  $\alpha_1$ -Untereinheit formt

dabei die eigentliche Kanalpore und enthält den Spannungssensor und den „Gating-Apparat“, während die übrigen Untereinheiten regulatorische Funktion besitzen (Catterall 1995, 2000, Catterall et al. 2003, 2005, Ertel et al. 2000, Lacinová 2005). Die  $\alpha_2$ -Untereinheit ist für die extrazelluläre Kanalstruktur und die Kanalstimulation verantwortlich, während die mit  $\alpha_2$  gekoppelte  $\delta$ -Untereinheit für die spannungsabhängige Aktivierung und steady-state-Inaktivierung erforderlich ist.

Die 5 beschriebenen Subtypen und deren verschiedene Strukturtypen lassen sich zu zwei Klassen, den bei geringer Spannung aktivierten (low voltage activated (LVA)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom T-Typ und den bei hoher Spannung aktivierten (high voltage activated (HVA))  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-, /N-, /P/Q- und R-Typ zuordnen (Ertel et al. 2000, Lacinová 2005).

Spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle agieren als Vermittler zwischen elektrischem Signaling und intrazellulären Botenmolekülen (Hille 2001). Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalöffnung bewirkt im Zytoplasma einen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration, der Lebensfunktionen wie Erregbarkeit, Rhythmisierung, Transmitter- oder Hormonfreisetzung, Kontraktion, Metabolismus und Genexpression kontrolliert (Tsien & Tsien 1990). Das Öffnungs- und Schließverhalten der Kanäle wird als „gating“ bezeichnet. Mindestens drei Zustände sind möglich: geöffnet, geschlossen und inaktiviert. Geschlossene Kanäle können durch Depolarisation aktiviert werden, was zum Öffnen und selektiven Ionendurchtritt, messbar als elektrischer Stromfluss, führt. Die geöffneten Kanäle können während der Depolarisation inaktiviert (verschlossen) werden und erst wieder durch eine Repolarisation der Membran aktivierbar sein. Das Öffnen einzelner Kanäle erfolgt rascher und vollständiger bei größerer Depolarisation, ähnlich wie bei spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanälen. Typischerweise öffnen sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle innerhalb weniger Millisekunden nach Membrandepolarisation und schließen sich (deaktivieren) innerhalb von Bruchteilen einer Millisekunde nach Repolarisation. Die Inaktivierung, also das Schließen der Kanäle bei anhaltender Depolarisation, variiert in seiner Geschwindigkeit innerhalb der verschiedenen Typen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen zwischen Zehntel Millisekunden bis einigen Sekunden. Bemerkenswert hoch ist die Ionenselektivität,  $\text{Ca}^{2+}$  ist Hauptladungsträger. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeation kann bei hohem elektrochemischen Gradienten Millionen Ionen pro Sekunde betragen. Physiologisch erreichte Konzentrations- und Spannungsgefälle über die Zellmembran gestatten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gemäßigte Durchflussraten, die aber ausreichend für einen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf  $> 1 \mu\text{M}$  innerhalb  $\sim 1 \mu\text{m}$  Abstand von der Kanalpore sind.



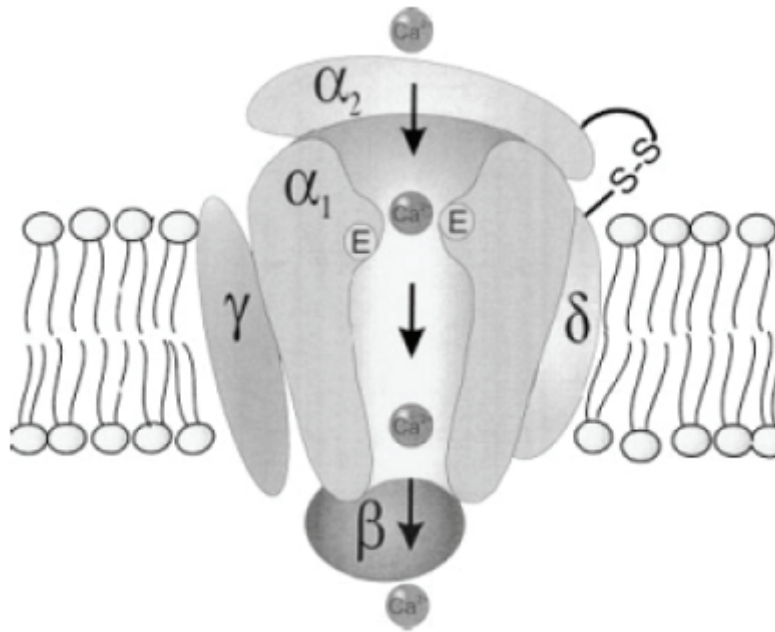


Abb.2.9. allgemeine Struktur eines spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (aus Klugbauer et al. 2003).

Während in elektrisch erregbaren Zellen wie Neuronen und Muskelzellen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die Plasmamembran die führende Rolle bei der Generierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen übernimmt und spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erheblichen Anteil daran haben, kommt diesen Kanälen in nicht-erregbaren Zellen wie Epithelzellen eine eher untergeordnete Bedeutung zu, da hier vorrangig die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma einen speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bewirkt (Parekh & Putney 2005). Speziell für Linsenepithelzellen lagen zum Zeitpunkt der Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Versuche noch keine Erkenntnisse über das Vorhandensein von spannungsabhängigen T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vor. Die Expression von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in kultivierten primären humanen Linsenepithelzellen wiesen bereits Shepard & Rae (1998) nach, indem sie mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus mRNA zu dieser komplementäre DNA (cDNA) erstellten und die darin enthaltene komplette cDNA-Sequenz für diesen Ionenkanal identifizierten. Demgegenüber sind in Fibroblasten T- und L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle präsent (Chen et al. 1988, Estacion & Mordan 1993, Wang et al. 1993, Yang & Huang 2005).

### 2.5.3 Der Kalziumantagonist Mibefradil

Kalziumantagonisten sind Verbindungen, die direkt am  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal angreifen und gebunden werden. Durch diese Bindung an den Kanal wird die Bewegung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die Kanalpore vermindert (oder bei Agonisten erhöht), ohne Veränderung

der Leitfähigkeit des offenen Kanals, aber durch Veränderung der Öffnungswahrscheinlichkeit und Dauer (Kübler & Tritthart 1996).

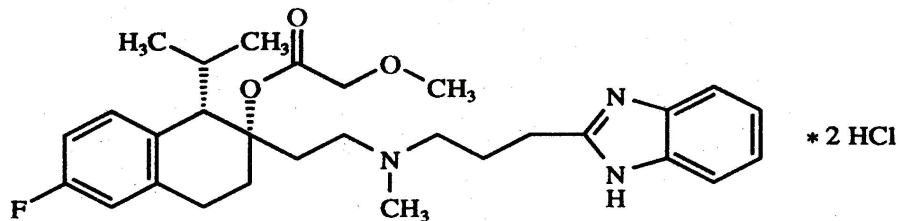


Abb.2.10. Strukturformel des Kalziumantagonisten Mibefradil.

Mibefradil ist ein Benzimidazolyl-substituiertes Tetralin-Derivat, welches strukturell Verapamil ähnelt (s. Abb.2.10; Clozel et al. 1990). Es gehört nicht zu den Dihydropyridinen und unterscheidet sich von anderen Kalziumkanal-Antagonisten durch seine Eigenschaft, vorzugsweise low-voltage-activated (LVA) T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu blockieren, und zwar 10 bis 20-fach selektiver als high-voltage-activated (HVA) L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Mishra and Hermsmeyer 1994, Lacinová et al. 2000a). Bei therapeutischen Blutplasma-Konzentrationen von 0,5-1  $\mu\text{M}$  (Mishra & Hermsmeyer 1994) ist von Mibefradil eine Blockierung > 80% von T-Kanälen, aber nur 25% der L-Kanäle zu erwarten (Hermsmeyer 1998, Welker et al. 1998). Mibefradil wurde 1997 klinisch als Medikament zur Behandlung von Angina und Hypertonie eingeführt, aber aufgrund pharmakokinetischer Medikament-Interaktionen, die auf seiner Zytochrom P-340 3A4-inhibierenden Wirkung beruhten, im Juni 1998 vom Markt zurückgezogen (Po & Zhang 1998). Im Kardiovaskular-System blockiert Mibefradil HVA L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, was eine antihypertensive Aktivität und Verlangsamung des Herzschlags ohne Abnahme der Herzkontraktion bewirkt (Clozel et al. 1997). In vaskulären und atrialen Myozyten blockiert es LVA T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, was den Schluß nahe legt, dass die bradykardiven und gefäßerweiternden Eigenschaften teilweise durch den Block dieser Kanäle vermittelt werden (Bezprozvanny & Tsien 1995, Clozel et al. 1997). Untersuchungen an heterolog exprimierten, klonierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal- $\alpha_1$ -Untereinheiten der 5 Subtypen spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bestätigten den Block sowohl von HVA als auch LVA  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch Mibefradil (Bezprozvanny & Tsien 1995, Cribbs et al. 1998), wobei letztere eine ungleich höhere Sensitivität gegenüber diesem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Antagonisten aufwiesen.

Die Wirkung von Mibefradil ist nicht auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beschränkt, sondern betrifft auch andere Ionenkanäle, wie Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen für z.B.  $\text{K}^{+}$ -

(Gomora et al. 1999), Cl<sup>-</sup>-Kanäle (Nilius et al. 1997) und Na<sup>+</sup>-Kanäle (Eller et al. 2000) ergaben. Neben der Fähigkeit, T-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zu blockieren, inhibiert Mibefradil das Wachstum verschiedener Zelltypen (Schmitt et al. 1995). Die experimentell erzielten Ergebnisse fallen je nach Zelltyp sehr unterschiedlich und teilweise kontrovers aus. So führte eine Überexpression von T-Kanälen in HEK-293 Zellen nicht zu einer Veränderung der Zellwachstumsrate (Chemin et al. 2000), obwohl angenommen worden war, dass die Proliferationsinhibition von glatten Muskelzellen und Neointimaformation durch Mibefradil auf seine Wirkung auf T-Kanäle zurückzuführen ist (Schmitt et al. 1995).] Demgegenüber gelangten Rodman et al. (2005) in Untersuchungen an Myozyten aus humanen Pulmonararterien zum Resultat, dass sowohl die selektive Blockade der Ca<sub>v</sub>3.1-Expression durch small interfering RNA (siRNA) als auch die pharmakologische Blockade von T-Typ-Kanälen durch 10 µM Mibefradil die durch 5% Serum bedingte Proliferation vollständig inhibierte und den Zellzykluseintritt verhinderte. Eine antiproliferative Wirkung von Mibefradil stellten Bertolesi et al. (2002) an Y79 und MCF-7 Zellen fest, an deren Vermittlung ebenfalls T-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle beteiligt zu sein schienen. Des weiteren konnte eine adhäsionshemmende Wirkung von Mibefradil auf humane Leukozyten nachgewiesen werden (Nebe et al. 2002).

### 3 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, wissenschaftliche Grundlagen für einen neuen Ansatz zur Nachstarprävention zu erarbeiten. Dieser Ansatz besteht darin, das postoperative Auswachsen äquatorialer Linsenepithelzellen auf die Hinterkapsel durch Hemmung der Zelladhäsion zu verhindern. Die Hemmung der Integrin-vermittelten Zelladhäsion soll durch Eingriff in die Kalzium-abhängige Signaltransduktion erreicht werden. Mit dem Kalzium-Antagonisten Mibefradil steht dafür ein potenter Blocker spannungsabhängiger T-Typ-Kalziumkanäle zur Verfügung, für den eine adhäsionshemmende Wirkung bereits in humanen Leukozyten nachgewiesen werden konnte (s. Einleitung). Im experimentellen Ansatz soll eine mögliche adhäsionshemmende Wirkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Antagonisten Mibefradil auf Linsenepithelzellen untersucht werden. Dabei stehen, ausgehend von der klinischen Problematik, Untersuchungen an kultivierten primären humanen Linsenepithelzellen im Vordergrund. Es soll durch Analyse zellulärer Effekte von Mibefradil festgestellt werden, über welche Mechanismen der Kalziumantagonist die Blockierung der Integrin vermittelten Funktionen bewirkt: durch eine reduzierte Integrin-Expression, die die Adhäsionsfähigkeit verändert und/oder eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Blockade. Zwei Annahmen werden dabei getroffen: Der Mechanismus der Inhibition der Zelladhäsion ist mit einer verminderten Expression definierter Integrine durch Mibefradil verknüpft. Zweitens wird die Existenz spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle mindestens vom T-Typ vorausgesetzt. Beide Bedingungen werden experimentell überprüft.

Im einzelnen ergeben sich folgende Arbeitshypothesen:

- I. Der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalantagonist hemmt in LEZ in vitro Integrin-vermittelte Zellprozesse, wie Adhäsion, Spreading, Matrixproduktion, Proliferation und Überleben.
- II. Der inhibitorische Effekt von Mibefradil auf Integrin-vermittelte Zellfunktionen ist dosis- und zeitabhängig.
- III. Mibefradil moduliert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zellvorgänge über einen reduzierten Kalziumeinstrom in die Zelle.

Aus den experimentellen Ergebnissen soll abschliessend eine Aussage zur potentiellen Eignung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Antagonisten Mibefradil hinsichtlich einer klinischen Verwendbarkeit bei der Nachstarprävention getroffen werden.

## 4 Material und Methoden

Bei den zellbiologisch orientierten Arbeiten kamen vor allem immunzytochemische Testverfahren in Verbindung mit fluoreszenzmikroskopischer Auswertung zur Anwendung. Ergänzend wurde die Patch-Clamp-Technik aus dem Bereich der Elektrophysiologie eingesetzt. Für detaillierte morphologische Informationen von Zelloberflächen wurde die elektronenmikroskopische Darstellung mit dem Rasterelektronenmikroskop genutzt.

Der überwiegende Teil der Untersuchungen wurde an primären humanen Linsenepithelzellen durchgeführt. Diese Primärzellen wurden von Kapselsackexplantaten gewonnen, die zur Linsenkapseleröffnung während der Katarakt-Chirurgie routinemäßig entnommen werden. Diese Zellen wurden gewählt, weil sie das am leichtesten zugängliche Primärzellmaterial mit vergleichbaren Ausgangsbedingungen (Zelltransformation, -proliferation und -migration infolge Wundreiz und Entzündungsreaktion) darstellen. Zudem sollten die Untersuchungen an Zellen erfolgen, die in ihren Eigenschaften den in vivo Nachstar-verursachenden Zellen möglichst nahe kommen. Aus diesem Grund wurde vor der Anwendung des Kalziumantagonisten zunächst eine ausführliche phänotypische Charakterisierung vorgenommen. Dieses Vorgehen sollte eine Korrelation der Versuchsergebnisse mit dem entsprechenden Zellphänotyp ermöglichen sowie Rückschlüsse auf das Zellverhalten in vivo erlauben. Für Untersuchungen zum Aktinzytoskelett, der Integrinexpression, Proliferation und Apoptose wurde die humane Linsenepithelzelllinie HLE-B3 verwendet. Zur Beurteilung der Tight Junction-Organisation wurden zum Vergleich primäre humane Fibroblasten sowie die Leberepithel-Zelllinie mHepR1 hinzugezogen. Primäre humane Hornhautendothelzellen im natürlichen Monolayerverband dienten der Feststellung des Effektes des  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Mibefradil auf die Zellmorphologie angrenzender Gewebe im Auge.

Ausgehend von der phänotypischen Charakterisierung primärer humaner Linsenepithelzellen im Zustand nach der Katarakt-OP sollten systematisch Effekte des eingesetzten T-Kalziumkanalblockers Mibefradil auf die Zellen erfaßt werden. Untersucht wurden Morphologie, Adhäsion, Proliferation und die Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix. Einen weiteren Schwerpunkt bildete die Analyse verschiedener Aspekte und Stadien des Apoptosegeschehens. Darüber hinaus fanden Untersuchungen zur elektrophysiologischen Erregbarkeit und zu Ionenkanälen statt. Zum Vergleich wurden hinsichtlich ausgewählter Parameter alternative

Kalziumkanalblocker (L- und T-Kanalblocker) eingesetzt und deren Effekte mit denen des T-Kanalblockers verglichen.

## 4.1 Testsubstanzen

### 4.1.1 T-Kalziumkanalblocker Mibefradil

Für den Hauptteil der Experimente wurde der T-Typ-Kalziumkanalantagonist Mibefradil ((1S,2S)-2-[2-[(3-(2-Benzimidazolyl)propyl)methylamino]ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl methoxyacetate dihydrochloride, Ro-40-5967; Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)) verwendet. Mibefradil (MG = 568,56 g/mol) wurde als  $10^{-3}$  M Stammlösung in destilliertem Wasser gelöst und bei 4°C unter Sterilbedingungen aufbewahrt. Von dieser Stammlösung wurden die für die Experimente erforderlichen Konzentrationen vor Experimentbeginn jeweils frisch (in Medium) angesetzt. Der T-Kanalblocker wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,3  $\mu$ M - 30  $\mu$ M) über einen variierenden Zeitraum (2 h bis maximal 72 h) ins Medium zugegeben. Für die meisten Versuche wurden jedoch als Standard die Kombinationen 10  $\mu$ M und 20  $\mu$ M für 24 Stunden gebraucht. Diese Konzentrationen und Inkubationszeiten hatten in Vorversuchen an humanen Linsenepithelzellen deutliche Änderungen der Zellmorphologie und des Adhäsionsverhaltens ergeben. Die Dosisfindung orientierte sich am klinischen Gebrauch (therapeutische Konzentrationen 1 bis 10  $\mu$ mol/l, Konzentration im Blutplasma 0,5-1  $\mu$ M; s. Kap. Der Kalziumantagonist Mibefradil).

### 4.1.2 Alternativer T-Kalziumkanalblocker Ethosuximid

Ergänzend zu den Zellkulturversuchen mit Mibefradil wurde als zweiter T-Kanalblocker Ethosuximid (2-Ethyl-2-methylsuccimide, MG = 141,2 g/mol; Sigma, Art.-Nr. E 7138) eingesetzt. Dies sollte vor allem Aufschluß darüber bringen, ob der Klasse der T-Kanalblocker eine einheitliche Wirkung auf hLEZ zugeschrieben werden kann.

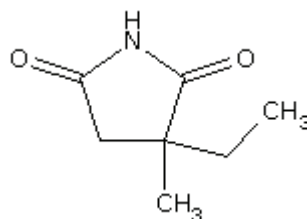


Abb.4.1. Strukturformel des Kalziumantagonisten Ethosuximid.

Ethosuximid wurde in den Testkonzentrationen 1 und 10 mM eingesetzt. Diese Substanz ist sehr lichtempfindlich und erforderte ein Arbeiten in lichtabgeschirmtem Umfeld. Als Stammlösung wurden 100 mg Ethosuximid in 1 ml 96%igem Ethanol gelöst (= 0,708 M) und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.1.3 L-Kalziumkanalblocker Nifedipin

Zum Vergleich der Wirkung von Vertretern der Substanzklassen T- und L-Kanalblocker wurde der L-Typ Kalziumkanalantagonist Nifedipin (1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-pyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester; Sigma, Art.-Nr. N 7634) eingesetzt.

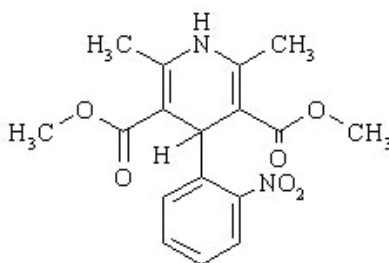


Abb.4.2. Strukturformel des Kalziumantagonisten Nifedipin.

Nifedipin (MG = 346,3 g/mol) wurde in 98%-igem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (Stammlösung 10 mM) und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt, da Nifedipin in gelöstem Zustand sehr lichtempfindlich ist. Für die Zellkulturversuche wurde Nifedipin lichtgeschützt für 24 Stunden in den Konzentrationen 3 µM, 30 µM und 300 µM zum Kulturmedium dazugegeben und die Zellen während dieser Zeit unter den üblichen Kulturbedingungen (37°C) inkubiert.

## 4.2 Humane Zellkultur

### 4.2.1 Gewinnung und Kultur primärer humaner Linsenepithelzellen

Primäre humane Linsenepithelzellen (hLEZ) wurden aus Kapselsackexplantaten gewonnen, die in der Universitätsaugenklinik Rostock routinemäßig während der Kataraktchirurgie entnommen wurden. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Kapselsackexplantat mit dem auf dem Kapselsack befindlichen Linsenepithel in steriles DMEM (Gibco) mit 10% FCS (Gibco), 1% Gentamicin (Sigma) und 1% Bufferall (Sigma) überführt (Zusammensetzung verwendeter Medien, Puffer und Lösungen s. Anhang). Die Explantate wurden jeweils einzeln in 24-Multiwell-Zellkulturplatten (Greiner, Bio One) in 1

ml o.g. Nährmedium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Multiwell-Zellkulturplatten wurden zur Verbesserung des Zellwachstums und Erhöhung der Zellausbeute mit Ausnahme der Versuchsansätze zur Untersuchung der extrazellulären Matrixproteine zuvor mit Kollagen I (Rattenschwanz-Kollagen Typ I, TEBU, Frankfurt/Main, Deutschland) beschichtet. Dafür wurde die Kollagen-I-Lösung (2 mg/ml in 0,1%iger Essigsäure mit 50 µg/ml Gentamicin) mit 0,1%iger Essigsäure 1:10 zur Arbeitslösung verdünnt. Die Beschichtung erfolgte durch gleichmäßigen Auftrag von 20 µg/cm<sup>2</sup> der Arbeitslösung. Das beschichtete Material wurde über Nacht unter Sterilbedingungen luftgetrocknet. Durch ihre starke Elastizität rollt sich die Linsenkapsel bei Verletzungen nach außen um. Deshalb sanken die Kapselsackfragmente in der Regel mit der epithelbesetzten Seite nach unten auf den Schalenboden und adhärten in der Regel innerhalb von zwei Tagen. In der ersten Woche wurde das Medium nur einmal gewechselt, danach je nach Wachstum alle drei Tage. Die Kultur wurde solange fortgesetzt, bis die Proliferation so weit fortgeschritten war, daß die Linsenepithelzellen vom Kapselsack weg auch auf den Schalenboden auswuchsen und bei der Kontrolle unter dem Lichtmikroskop einen konfluenten Ring um den Kapselsack bildeten. Dieses Stadium war je nach Wachstumsgeschwindigkeit frühestens nach einer Woche, in der Regel aber zwischen 10 und 14 Tagen erreicht. Dann wurden die Zellen enzymatisch durch 10-minütige Einwirkung von Accutase™ (proteolytische und kollagenolytische Enzymgemisch-Lösung in Dulbecco's PBS mit 0,5 mM EDTA x 4 Na; PAA, Cölbe) bei 37°C abgelöst. Anschließend wurde jeweils der Inhalt mehrerer Wells in Kulturmedium überführt und bei 2000 U/min für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in frischem Medium resuspendiert und auf Kollagen I-beschichtete (Rattenschwanzkollagen Typ I, BD Biocoat), runde (Ø 22 mm) Deckgläser (BD Biocoat) aliquotiert. Zur Untersuchung der Produktion von extrazellulären Matrixproteinen wurden die hLEZ auf unbeschichteten Multiwell-Zellkulturplatten und unbeschichteten 20x20 mm Deckgläser (Menzel) kultiviert, um einen Einfluss der Beschichtung mit Kollagen I auf die Synthese weiterer Matrixproteine auszuschließen, unerwünschte Fluoreszenz durch die Kollagen-I-Beschichtung zu vermeiden und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten.

Die Zellen wurden dann für 1-2 Tage inkubiert, bis die für die jeweiligen Versuche gewünschte Zelldichte (Konfluenz oder Subkonfluenz) erreicht war. Zur Kontrolle wurden sämtliche Zellkulturen regelmäßig hinsichtlich Morphologie und Zelldichte sowie vor und nach der Behandlung mit Testsubstanzen unter einem inversen Lichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss Jena, Deutschland) begutachtet.



#### 4.2.2 Primäre humane Fibroblasten

Primäre humane Fibroblasten (hFB), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. P. Müller (Zentrum für Medizinische Forschung, Arbeitsbereich Zellbiologie), wurden 14 Tage in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Greiner, Bio One, Frickenhausen, Deutschland) in DMEM (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% FCS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1% Antibioticum/Antimycoticum (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1% Gentamicin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen enzymatisch abgelöst wie im Abschnitt zur Gewinnung und Kultur primärer humaner Linsenepithelzellen beschrieben und eine 24-Stunden-Deckglaskultur angelegt.

#### 4.2.3 Primäre humane Hornhautendothelzellen

Zwei nicht transplantationsfähige humane Spender-Hornhäute aus der Hornhautbank der Universitätsaugenklinik Rostock wurden in Hornhautmedium I (Zentralapotheke Universität Rostock; Zusammensetzung s. Anhang) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über einen Gesamtzeitraum von 7 Tagen kultiviert. Zur lichtmikroskopischen Beurteilung war jeweils zur besseren Darstellung der Endothelzellen ein 3-minütiges Einlegen der Hornhäute in hypotone BSS Augenspüllösung (Rayner), welche ein Quellen der Interzellularräume bewirkt, nötig. Zum Entquellen wurden die Hornhäute anschließend kurz in Hornhautmedium II (Zentralapotheke; Zusammensetzung s. Anhang) gelegt und dann normal im Kulturmedium weiterkultiviert.

#### 4.2.4 Zelllinie HLE-B3

Für semiquantitative Untersuchungen mit dem Durchflusszytometer wurde die Ad12-SV40 Hybridvirus-immortalisierte humane Linsenepithel-Tumorzelllinie HLE-B3 (ATCC, Nr. CRL-11421, Kultur freundlicherweise überlassen von U.P.Andley, Dept. of Ophthalmology, Washington University School of Medicine), verwendet, da die verfügbare Menge an Primärzellen dafür nicht ausreichte. Die Kultur erfolgte hier in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Greiner, Bio One) in DMEM (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% FCS (Gibco Invitrogen) und 1% Gentamicin (Ratiopharm). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert. Dazu wurde das Medium abgezogen, die Zellen 2x mit sterilem, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS (Gibco Invitrogen)

gewaschen und anschließend 5 Minuten mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA (Gibco Invitrogen) in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS; im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in o.g. Kulturmedium aufgenommen und bei 2000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert, in Ø 35 mm-Zellkultur-Petrischalen (Greiner, Bio One) aliquotiert und weitere 24 Stunden bis zum Versuchsbeginn kultiviert. Für die Darstellung des Aktin-Zytoskeletts wurden 24 Stunden-Deckglaskulturen angelegt.

#### 4.2.5 Zelllinie mHepR1

Die immortalisierte Maus-Hepatozytenzelllinie mHepR1 wurde unter gleichen Bedingungen wie die HLE-B3 Zellen bis kultiviert (s. Abschnitt 4.2.4). Konfluente Deckglaskulturen wurden zum Vergleich für den Tight-Junction Nachweis (ZO-1 Präparation) verwendet.

### 4.3 Lichtmikroskopische Analyse primärer humaner Hornhautendothelzellen

Die morphologische Untersuchung des Cornea-Endothels wurde in das Gesamtvorhaben mit einbezogen, um die Wirkung des T-Kanalblockers Mibefradil auch auf angrenzende Gewebe im Auge ansatzweise zu erfassen. Hintergrund war die Forderung, im Kapselsack verbliebene Linsenepithelzellen möglichst selektiv und ohne schädliche Aus- bzw. Nebenwirkungen auf räumlich unmittelbar benachbarte Zelltypen am Vordringen in die optische Achse auf der hinteren Kapselsackwand zu hindern. Zu diesem Zweck wurden unbehandelte primäre humane Hornhäute nach Entnahme in Hornhautmedium I bei 37°C kultiviert und mit Mibefradil (Konzentration 10 und 20  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 7 Tagen inkubiert. In einem zweiten Versuchsansatz wurden 30 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Mibefradil für vier Tage zugegeben. Vor der mikroskopischen Befundung wurden die Endothelzellgrenzen durch dreiminütiges Einlegen in hypotoner Pufferlösung (BSS), welches ein Quellen der Interzellularräume bewirkt, sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte unter einem inversen Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen) und wurde anhand von Videoprints dokumentiert.

Vor der Weiterkultivierung wurden die Hornhäute kurz in dextranhaltigem Medium (Hornhautmedium II) entquellen.

## 4.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen primärer humaner Linsenepithelzellen

### 4.4.1 Prinzip der direkten und indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Fluoreszierende Stoffe können durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden. Dies bedeutet, dass Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Unter Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge (längerwellig als die Anregungs-Wellenlänge) gelangen die angeregten Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Diese Eigenschaft nutzt man aus, indem man bestimmte Stoffe mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) markiert und so in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen kann. Um bestimmte zelluläre Proteine oder andere Makromoleküle mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, werden in der Regel fluoreszenzmarkierte Antikörper benutzt, die spezifisch an ihre entsprechenden Zielstrukturen (Antigene) binden. Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung bindet ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Primärantikörper direkt an das Antigen der Zelle und wird mittels Mikroskopie dargestellt. Bei der meist verwendeten indirekten Immunfluoreszenz-Methode bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt. Diese Methode erlaubt mehr Flexibilität und ist um ein Vielfaches empfindlicher, da verschiedene Zweitantikörper mit den verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren können.

Folgende Primär- und Sekundärantikörper bzw. Fluorophorkonjugate wurden zum Nachweis spezifischer zellulärer Moleküle verwendet (s. Tab.4.1 - Tab.4.3):

Tab.4.1. Übersicht über die zur Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten Primärantikörper.

<b>Antigen</b>	<b>Host</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Kollagen I	Kaninchen	Rockland	1:100 in PBS
Anti-Kollagen-II	Kaninchen	Rockland	1:100 in PBS
Anti-Kollagen IV	Maus	Sigma	1:100 in PBS
Anti-Laminin	Maus	Sigma	1:100 in PBS
Anti-Fibronektin	Kaninchen	Sigma	1:100 in PBS
Anti-ZO-1	Kaninchen	Zymed	1:100 in PBS
Anti- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin	Maus	Sigma	1:60 in PBS
anti-Bax	Kaninchen	BD PharMingen	1:100 in PBS

Tab.4.2. Übersicht über die zur Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten Sekundärantikörper.

Spezifität	Konjugation	Firma	Verdünnung	Excitations- Maximum [nm]	Emissions- Maximum [nm]
Ziege anti-Kaninchen	Alexa Fluor™ 488	Molecular Probes	1:300	495	519
Ziege anti-Maus	Alexa Fluor™ 488	Molecular Probes	1:300	495	519

Tab.4.3. Übersicht über die zur Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten Fluorophor-Konjugate.

Konjugation	Nachweis	Firma	Verdünnung	Excitations- Maximum [nm]	Emissions- Maximum [nm]
Phalloidin-FITC	F-Aktin	Sigma	1:40	495	513
Phalloidin-TRITC	F-Aktin	Sigma	1:100	540-545	570-573
Annexin-V-EGFP	Phosphatidylserin	BD Clontech	unverdünnt	488	509
MitoTracker Red CMXRos	Mitochondrien	Molecular Probes	1:10000	579	599
PhiPhiLux™ G2D2	Caspase-3-Substratspaltung	Oncolmmunin	unverdünnt	552	580

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Deckglaspräparate wurde an einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Oberkochen) mit einem 63x Öl-Immersionsobjektiv (Plan-Neofluar (1,25 oil/0,17), Zeiss) durchgeführt.

#### 4.4.2 Nachweis der Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen

Für den immunzytochemischen Nachweis wurden die hLEZ auf unbeschichteten Multiwell-Zellkulturplatten und Deckgläsern kultiviert, um einen Einfluss der Beschichtung mit Kollagen I auf die Synthese weiterer Matrixproteine auszuschliessen und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten.

Die auf dem Deckglas konfluent gewachsenen hLEZ wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd (PFA; Merck) in PBS fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen bei Raumtemperatur 1h mit 0,1% Triton-X-100 (Merck) in PBS permeabilisiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurde

der primäre Antikörper (s. Tab.4.1) zugegeben. Zum Kontrollpräparat wurde statt des Antikörpers das gleiche Volumen PBS gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers (s. Tab.4.2). Das Präparat wurde dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur dunkel gestellt und anschließend zweimal mit PBS und einmal mit Aqua dest. gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläser mit Einbettmedium für Fluoreszenzmikroskopie auf Glas-Objektträger (Marienfeld) eingebettet und zum Aushärten mindestens 24 Stunden lichtgeschützt und gekühlt verwahrt.

#### 4.4.3 Nachweis des Tight-Junction-assoziierten Proteins Zonula occludens I (ZO-1)

Zur Untersuchung epithelzelltypischer Zell-Zell-Verbindungen, speziell des an der Ausbildung der Tight junctions beteiligten Proteins ZO-1, waren konfluente Zellkulturen auf dem Deckglas Voraussetzung, denn nur enger Zell-Zell-Kontakt ermöglicht die Ausbildung dieser undurchlässigen Verbindungen zur Verhinderung extrazellulären transepithelialen Molekültransports. Die Zellen (hLEZ, mHepR1, primäre humane Fibroblasten) wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Aceton pro Deckglas fünf Minuten bei -20°C fixiert und permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde für 15 Minuten mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma) in PBS gegen unspezifische Antikörperbindungen geblockt. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. Tab.4.1) 1:100 verdünnt in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Daran schloß sich nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS die 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper (s. Tab.4.2) 1:300 in PBS verdünnt an. Abschließend wurde dreimal mit PBS und einmal mit Aqua dest. gewaschen und das Deckglaspräparat auf Objektträger eingebettet und bis zur Auswertung lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

#### 4.4.4 Fluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts

Subkonfluente Deckglaskulturen von hLEZ wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte das Permeabilisieren mit 0,1% Triton X-100 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit in PBS verdünntem Phalloidin-FITC (s. Tab.4.3) lichtgeschützt

inkubiert. Die Kontrolle wurde unter sonst gleichen Bedingungen mit PBS bedeckt. Das abschließende Waschen, Einbetten sowie die Lagerung und Auswertung erfolgte wie bei der Präparation zum Nachweis der Matrixproteinproduktion.

#### 4.4.5 Nachweis der glattmuskulären Aktin-Isoform $\alpha$ -Smooth muscle actin

Die hLEZ wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit 4% PFA 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, wieder dreimal mit PBS gewaschen und mit 0,1% Triton X-100 für 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 15 Minuten mit 4% BSA bei Raumtemperatur geblockt, erneut 3x gewaschen und der Primärantikörper (s. Tab.4.1) zugegeben (30 Minuten, Raumtemperatur). Anschliessend wurden die hLEZ zweimal gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (s. Tab.4.2) 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Spülen mit Aqua dest. wurden die Proben eingebettet und analysiert.

#### 4.4.6 Nachweis später Apoptosestadien durch TUNEL

*Die DNA-Spaltung während der Apoptose ergibt sowohl niedermolekulare doppelsträngige DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen) als auch DNA-Einzelstrangfragmente von hohem Molekulargewicht. Diese Einzelstrangbrüche ("nicks") können durch die Markierung freier 3'-OH-Enden durch modifizierte Nukleotide in einer enzymatischen Reaktion identifiziert werden. Der TUNEL-Test (TdT-mediated dUTP nick end labeling) bedient sich dazu der Terminalen deoxynucleotidyl-Transferase (TdT), welche die Polymerisation von Nukleotiden an freien 3'-OH-DNA-Enden Template-unabhängig katalysiert. Die modifizierten Nukleotide können anhand inkorporierter Fluorescein-Moleküle per Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie detektiert und quantifiziert werden.*

Die hLEZ wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS für zwei Minuten auf Eis mit 0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumcitrat permeabilisiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und 15 Minuten mit 1% BSA in PBS gegen unspezifische Bindungen geblockt. Wieder wurde dreimal gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, daß anschließend der Boden um die Deckgläser herum gut abtrocknete. Dann wurde die Apoptose-Positivkontrolle 10 Minuten bei Raumtemperatur mit DNase I (Grad 1, 1mg/ml in Aqua dest.) behandelt, um definierte DNA-Strangbrüche zu erreichen. Die Proben,

außer der Apoptose-Negativkontrolle, wurden mit TUNEL-Reaktionsgemisch, bestehend aus 5 µl Enzym und 45 µl Markerlösung (beides Apoptose-Testkit Roche), sowie 50 µl Phalloidin-TRITC (s. Tab.4.3) 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Apoptose-Negativkontrolle wurden nur Markerlösung sowie Phalloidin-TRITC zugegeben, die Inkubation erfolgte wie bei den anderen Präparaten. Abschließend wurde dreimal mit PBS und einmal mit Aqua dest. gewaschen und die Präparate mit Einbettmedium auf Objektträgern eingebettet.

#### 4.4.7 Nachweis früher Apoptosestadien

*Das Funktionsprinzip dieses Testes beruht auf Veränderungen an der Plasmamembran, die eine der frühesten morphologischen Veränderungen im Apoptoseverlauf darstellen. In frühapoptotischen Zellen wird das Zellmembranlipid Phosphatidylserin von der Innenseite an die Aussenseite der Zellmembran verlagert. Dieser Vorgang geht dem Verlust der Membranintegrität voraus, der für die späten Stadien des Zelltods charakteristisch ist. Dieses frühe Apoptosestadium ist durch TUNEL noch nicht erfassbar, weil es zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu DNA-Strangbrüchen kommt. Deshalb wurden frühe Apoptoseabläufe mit Hilfe dieses Tests untersucht. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, Phospholipid-bindende Protein Annexin V (35-36 kD) besitzt eine hohe Affinität für Phosphatidylserin und bindet an Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin. Annexin V wird konjugiert an verschiedene Fluorochrome wie Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Biotin oder Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) angeboten und ermöglicht so den Nachweis frühapoptotischer Zellen.*

Der Test ist für die Analyse mittels Durchflusszytometrie konzipiert, das Protokoll wurde deshalb im vorliegenden Fall für adhärente hLEZ durch Nachfixierung abgewandelt.

Für diesen Versuch wurde das Apo Alert® Annexin V-EGFP Apoptosis Kit (Becton Dickinson) eingesetzt. Zunächst wurden die hLEZ auf dem Deckglas vorsichtig einmal mit Binding Buffer gewaschen. Dann wurden 200 µl Binding Buffer (1x konzentriert) mit 5 µl Annexin V-EGFP (s. Tab.4.3) gut gemischt zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen einmal mit Binding Buffer gewaschen und für 10 Minuten mit 1% PFA bei Raumtemperatur nachfixiert. Nach nochmaligem Waschen mit Binding Buffer wurden die Präparate mit Fluoreszenzeinbettmedium eingebettet und gekühlt und dunkel verwahrt.

#### 4.4.8 Apoptose-Nachweis durch Caspase-3-Aktivität

*Caspasen sind Proteasen, die während der Apoptose in Zellen aktiviert werden. Sie lassen sich nach ihrer Funktion in der Caspasenkaskade in Initiator- (z.B. Caspase-8, -9) und Effektor-Caspasen (u.a. Caspase-3, -6, -7) einteilen. Caspase-3 spaltet spezifische Substrate, z.B. den Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD). Auf der Substratspaltung basiert auch der Nachweis der Caspase-3-Aktivität. Zellen, deren Apoptose nachgewiesen werden soll, werden mit einem Protease-Substrat für Caspase-3 inkubiert. Jedes Substratmolekül enthält ein doppelt fluoreszenzmarkiertes Peptid, welches jedoch selbst kaum fluoreszenzaktiv ist. Erst das durch aktive Caspase-3 gespaltene Substrat kann zur Rot-Fluoreszenz angeregt und mit einem Rhodamin-Filterset detektiert werden.*

Für diesen Versuch wurden die hLEZ nach dem Passagieren unter in vierkammerige Objektträger (NUNC) eingesät und bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach 5- bzw. 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Mibefradil wurde das Kulturmedium vorsichtig entfernt und der Zellmonolayer mit Caspase-3-Substrat PhiPhiLuxG<sub>2</sub>D<sub>2</sub> (OncoImmunin, Inc.) überschichtet. Danach wurden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das PhiPhiLux-enhaltende Medium entfernt und dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in PBS sofort am Fluoreszenzmikroskop (LSM) mit dem Rhodamin-Filterset ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 552 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 580 nm) ausgewertet.

#### 4.4.9 Apoptose-Nachweis durch das proapoptotische Protein Bax

*Bax ist ein proapoptotisches Protein aus der Bax-Familie, die pro- und antiapoptotische Proteine umfasst. Bereits zu Beginn apoptotischer Vorgänge in Zellen verlagert sich Bax verstärkt aus dem Zytoplasma an die äußere Mitochondrienmembran. Dort formt dieses Protein Poren, was zur Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma und endgültiger Apoptosefestlegung führt ("point of no return"). Bax läßt sich durch einen Antikörper (anti-Bax, BD PharMingen), der im zweiten Nachweisschritt fluoreszenzmarkiert wird, nachweisen. Mitochondrien werden zum Nachweis einer Kolo-kalisation mit MitoTracker Red CMX Ros (Molecular Probes) fluoreszenzmarkiert.*

Für die Doppelfärbung wurden unter Standardbedingungen kultivierte subkonfluente hLEZ zunächst für 30 Minuten bei 37°C mit 500 nM MitoTracker Red CMX Ros (s. Tab.4.3) in Medium inkubiert. (Proben, die nur für eine Einfachfärbung mit anti-Bax vorgesehen waren bzw. zur Kontrolle nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt werden



sollten, wurden über diese Zeit weiter im Kulturmedium gehalten.) Dann wurde dreimal mit PBS gewaschen und 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde für 30 Minuten mit anti-Bax (s. Tab.4.1) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Spülen mit Aqua dest. wurden die Proben eingebettet und analysiert.

#### 4.4.10 Analyse der basalen Kontaktfläche von hLEZ

*Werden kultivierte Zellen enzymatisch abgelöst und neu eingesät, sind sie zunächst von kugelförmiger Gestalt. Mit zunehmender Adhäsion am Boden des Zellkulturgefäßes flachen sich die Zellen immer mehr ab und die vom Zellkörper bedeckte Fläche vergrößert sich. Zum Abschluss des Adhäsionsvorgangs sind die Zellen flach auf dem Kulturgefäßsboden ausgebreitet. Dieser Vorgang wird als "spreading" bezeichnet und korreliert mit der Ausbildung von Fokalkontakten und entsprechender Umordnung des Aktin-Zytoskeletts. Umgekehrt kann eine Zelle auf einen äusseren Reiz mit einer Kontraktion und Neuorientierung des Zytoskeletts reagieren. Zur Untersuchung des Einflusses von Mibefradil auf die Zelladhäsion wurde deshalb die von der Zelle bedeckte Grundfläche gemessen.*

Für diesen Versuch wurden die hLEZ auf gleiche Weise wie für den Nachweis früher Apoptosestadien mittels Annexin-V-FITC-Testkit präpariert. Die Inkubationszeiten wurden zur Beurteilung rasch einsetzender Zellreaktionen kürzer gewählt (2 und 4 Stunden), die Mibefradil-Konzentrationen wurden beibehalten (10 und 20  $\mu\text{M}$ ). Als Kontaktfläche zwischen Zelle und Deckglas wird hier die von der ausgebreiteten Zelle maximal bedeckte Fläche bezeichnet. Am Fluoreszenzmikroskop wurden pro Präparat von je 40 Zellen die maximale Zellgrundfläche ausgemessen und die Mittelwerte statistisch miteinander verglichen (s. Abschnitt 4.8. Statistik).

### 4.5 Rasterelektronenmikroskopie

#### 4.5.1 Prinzip und Probenvorbereitung

Da die Morphologie primärer hLEZ und Hornhautendothelzellen im konventionellen Lichtmikroskop aufgrund geringer Helligkeitskontraste nur begrenzt darstellbar ist, wurde

zum detaillierteren Betrachten der Zelloberflächengestalt Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie angefertigt. Diese wurden im Rasterelektronenmikroskopischen Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock, unter der Leitung von Prof. Dr. L. Jonas, an einem Gerät des Typs DSM 960 A der Firma Carl Zeiss, Oberkochen analysiert. Da die Präparate dazu trocken und elektrisch leitend sein müssen, erfolgte eine einstündige Behandlung mit 4%igem Glutaraldehyd (Kühlschrank). Danach wurden die Proben mit Natrium-Phosphatpuffer gespült und 30 Minuten mit 0,5%-iger Osmiumsäure (Kühlschrank) behandelt, gefolgt von nochmaligem Spülen mit Natrium-Phosphatpuffer. Bei Präparaten auf Glas oder einzelnen Gewebestücken wurde eine Acetonentwässerung (in Stufen von je 5 Minuten 30%, 50%, 75% und 15 Minuten 92% und 2x 100% in Aqua dest.) vorgenommen und anschließend eine Kritische-Punkt-Trocknung (Critical point dryer K 850 der Firma EMITECH Röntgenanalytik Messtechnik GmbH, Taunusstein, Deutschland) durchgeführt. Bei Präparaten auf Polystyrol und anderen Kunststoffen, die keine Acetonbehandlung vertragen, wurde mit Alkohol in denselben Schritten entwässert und abschließend luftgetrocknet. Anschließend wurde durch Aufdampfen (Sputtern) eines 15-50 nm dünnen, homogenen Goldfilms im Vakuum (Sputter-Coater SCD 004 von BAL-TEC, Walhuf, Deutschland) eine leitfähige Probenoberfläche geschaffen.

#### 4.5.2 Darstellung der Zelloberfläche von hLEZ und primären Kaninchen-Hornhaut-Endothelzellen

Unter Normbedingungen (s. Kap.4.2.1) auf unbeschichteten Deckgläsern (Menzel) bzw. in Polystyrol Multiwellplatten (Greiner) kultivierte hLEZ wurden wie o.g. präpariert. Die REM-Analyse wurde mit den Vergrößerungen 200x, 500x und 1000x durchgeführt.

In einem in vivo-Langzeitversuch zur Untersuchung des Effekts einer einmaligen Mibefradil-Injektion in die vordere Augenkammer auf die Zellmorphologie des Hornhautendothels wurde Kaninchen der Rasse New Zealand White Albino (Vertreiber: Carls River Deutschland; Alter 10 Monate, Gewicht 3000g) einmalig 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  in je ein Auge pro Tier injiziert und die Kaninchen nach 45 Tagen durch Pentobarbital-Injektion (Eutha® 77, Provect, 400 mg/kg) getötet. Unbehandelte und behandelte Hornhäute wurden entnommen und am Folgetag nach Befundung unter dem Lichtmikroskop und Erstellung von Printbildern für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung präpariert. Die Darstellung im REM erfolgte bei den Vergrößerungen 500x, 1000x, 3000x, 10000x.

## 4.6 Durchflusszytometrische Messungen

### 4.6.1 Prinzip

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften analysiert werden. Ein Laserstrahl (Wellenlänge  $\lambda = 488 \text{ nm}$ , durch einen Argon-Ionenlaser erzeugt) erfasst im Analysenpunkt die einzeln in einer Trägerflüssigkeit vorbeigeführten Zellen und misst simultan bis zu drei Fluoreszenzfarben sowie Vorwärtsstreulicht (als Maß für die relative Zellgröße) und Seitwärtsstreulicht (als Maß für die Zellgranularität). Voraussetzung ist, dass die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe bei 488 nm anregbar sind. Die Fluoreszenzfarben und das Streulicht werden durch spezielle Lichtfilter und –spiegel aufgetrennt und in verschiedenen Detektoren gemessen. Die gemessenen Signale lassen sich je nach Notwendigkeit linear oder logarithmisch verstärken. Für jeden Parameter ist der Messbereich in eine geräteabhängige Zahl von Kanälen eingeteilt.

Tab.4.4. Übersicht über die zur FACS-Analyse verwendeten Primärantikörper.

Antigen	Host	Firma	Verdünnung
anti-Integrin $\alpha_2$	Maus	Immunotech	1:6 in PBS
anti-Integrin $\alpha_3$	Maus	Immunotech	1:6 in PBS
anti-Integrin $\alpha_5$	Maus	Immunotech	1:6 in PBS
anti-Integrin $\alpha_6$	Maus	Immunotech	1:6 in PBS
anti-Integrin $\beta_1$	Maus	Immunotech	1:6 in PBS

Tab.4.5. Übersicht über die zur FACS-Analyse verwendeten Sekundärantikörper.

Spezifität	Konjugation	Firma	Verdünnung	Excitations-Maximum [nm]	Emissions-Maximum [nm]
Schaf anti-Maus	FITC	BD Biosciences	1:16	495	530

Tab.4.6. Übersicht über die zur FACS-Analyse verwendeten Fluorophor-Konjugate und Fluorochrome.

Label	Target	Firma	Verdünnung	Excitations-Maximum [nm]	Emissions-Maximum [nm]
Annexin-V-FITC	Phosphatidylserin	BD Clontech	unverdünnt	495	530
Propidiumjodid	DNA	Sigma		536	612

Aus der Anzahl von gemessenen Zellen pro Kanal ergibt sich eine Häufigkeitsverteilung für den jeweiligen Parameter. In der Datenauswertung können die Messergebnisse als Häufigkeitsverteilung oder als korrelierte Zweiparameterdarstellung (Punktplot) dargestellt werden.

Die Fluoreszenz wurde im FACScan Durchflusszytometer (BD Biosciences), ausgestattet mit einem 488 nm Argon-Ionen-Laser und einem Macintosh Power PC (G4), gemessen.

#### 4.6.2 Analyse der Expression von Integrin-Untereinheiten in HLE-B3 Zellen

Um den Einfluss von Mibefradil auf die Integrin-Expression zu untersuchen, wurden aufgrund notwendiger Mindestzellmengen von je  $1 \times 10^4$  Zellen je Einzelansatz HLE-B3 Zellen verwendet. Kultivierte HLE-B3-Zellen (s. Abschnitt 4.2.4) wurden 24 h mit verschiedenen Mibefradil-Konzentrationen (5, 10, 15, 20, 30  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA (Gibco Invitrogen) abgelöst, in Eagle's MEM (Gibco Invitrogen) suspendiert, zentrifugiert und in PBS gewaschen. Die sedimentierten Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen) wurden mit monoklonalen Primärantikörpern (s.Tab.4.1) gegen die Integrin-Subeinheiten  $\beta_1$  (CD29),  $\alpha_2$  (CD49b),  $\alpha_3$  (CD49c) und  $\alpha_5$  (CD49e) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen 30 min bei Raumtemperatur mit Maus-IgG<sub>1</sub> (BD Biosciences) inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (s. Tab.4.5) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, anschließend gewaschen und in PBS resuspendiert. Es wurden je 10.000 Zellen erfaßt und mit Hilfe von CellQuest Pro 4.0.1. analysiert. Die Ergebnisse sind als Einheiten der Fluoreszenzintensität ("arbitrary units") dargestellt.

#### 4.6.3 Nachweis frühapoptotischer Stadien in HLE-B3 (Annexin-V-FITC)

Unter Standardbedingungen (s. Abschnitt HLE-B3 Zellkultur) kultivierte HLE-B3 Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Mibefradil-Konzentrationen (5, 10, 15, 20, 30  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Nach Mediumabzug und zweimaligem Waschen mit PBS durch 5 minütige Inkubation mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA-Lösung wurden die HLE-B3 Zellen in DMEM-Medium (Gibco Invitrogen) mit 10 % Serum (Gibco Invitrogen) aufgenommen, zweimal mit kaltem PBS gewaschen, abzentrifugiert und das Zellpellet in Binding Buffer (10 mM HEPES (NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) im FACS-Röhrchen (Polystyrol-Rundbodenröhrchen, Falcon) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mit je 100  $\mu\text{l}$  Binding Buffer und 5  $\mu\text{l}$  Annexin-V-FITC-Lösung (ApoAlert® Annexin

V-FITC Testkit, BD Clontech) 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Negativkontrolle wurde dabei ohne Annexin-V-FITC angesetzt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die so markierten Zellen in je 500 µl CellFix™-Lösung (BD Biosciences) 1:10 verdünnt in Aqua dest. aufgenommen und innerhalb einer Stunde am FACScan gemessen. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

#### 4.6.4 Messung von Proliferation und Apoptose in HLE-B3-Zellen

*Die Apoptose wurde durch Bestimmung des DNA-Gehaltes der Einzelzellen nach DNA-Färbung mit Propidiumjodid am FACScan gemessen. Propidiumjodid ist ein nicht membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, der jedoch an die DNA und RNA von Zellen mit Membrandefekten bindet. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen kann Propidiumjodid in die Zellen eindringen und an die DNA und RNA binden. Die Fluoreszenzintensität von Propidiumjodid kann nach RNase-Verdau als Maß für den DNA-Gehalt der Zellen dienen. Apoptotische Zellkerne zeigen bei diesem Verfahren infolge der DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen während der Apoptose und anschließender Diffusion niedermolekularer DNA-Fragmente aus den Zellen heraus einen im Vergleich zu Kontrollzellen niedrigeren DNA-Gehalt in Form eines Sub-G<sub>1</sub>-Phase-Peaks.*

HLE-B3 Zellen wurden für 24 h mit Mibefradil inkubiert (5, 10, 15, 20, 30 µM). Die Zellen wurden dann 5 Minuten mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung trypsiniert, mit PBS gewaschen und mit 70% Ethanol über Nacht bei -20°C fixiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und 20 Minuten bei 37°C mit 1% RNase (Sigma) inkubiert und die DNA der Zellen durch Inkubation mit Propidiumjodid (50 µg/ml, Sigma) über Nacht bei 4°C markiert. Je  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro Ansatz wurden im FACScan mit CellQuest Pro 4.0.1. gemessen. Proliferierende Zellen (S+G<sub>2</sub>-Phase-Zellen) und apoptotische Zellen (sub-G<sub>1</sub>-Zellen) wurden mit Hilfe von ModFIT Vers. 3.0 (BD Biosciences) ausgewertet.

### 4.7 Elektrophysiologische Untersuchungen mit der Patch Clamp-Technik

#### 4.7.1 Prinzip

Sämtliche elektrophysiologische Untersuchungen wurden im Modus der Ganzzelleableitung des Voltage-Clamp-Verfahrens nach der durch Hamill et al. (1981) beschriebenen Methode durchgeführt (s. Abb.4.3.D). Damit kann der Strom, der durch alle simultan aktiven Ionenkanäle der gesamten Zellmembran fließt, über die Pipette

abgeleitet werden. Der abgeleitete Strom ergibt sich demnach aus allen Einzelströmen und stellt eine Art Mittelung dar, ohne den unmittelbaren Beitrag der einzelnen Kanäle sichtbar zu machen. Dieser Gesamtstrom lässt sich dann durch Verwendung geeigneter Testspannungspulse und spezifischer Ionenkanalblocker (zum Identifizieren einzelner Ionenströme und zum Erfassen ihres Anteils am Gesamtstrom) in seine Teilkomponenten zerlegen. Das Potential der Zelle wird durch eine vom Experimentator gewählte Kommandospannung vorgegeben (s. Abb.4.3.A), d.h. die Zelle wird auf ein bestimmtes Membranpotential „geklemmt“ („Clamp“).

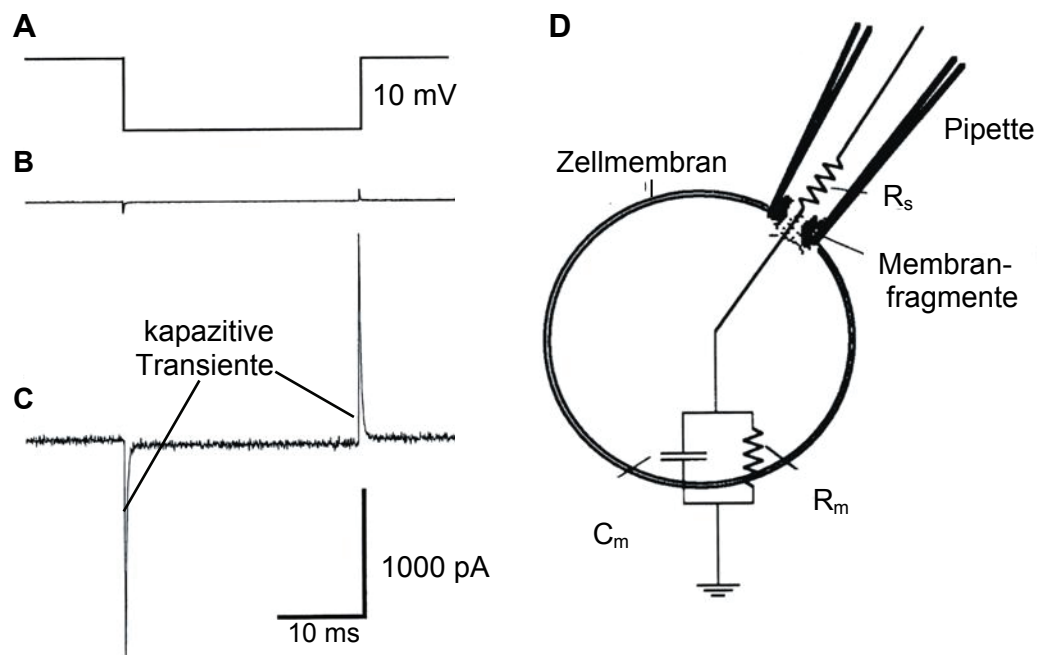


Abb.4.3. Stromantworten bei Ausbildung der Ganzzelleableitung und Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung. 10-mV-Kommandospannungspuls (A). Stromregistrierung nach Ausbildung der Cell-attached-Konfiguration (B) und Stromregistrierung nach Durchbrechen der Membran (C); kapazitive Transiente: kurzzeitige kapazitive Ladeströme zur Umladung der Membran bei Spannungssprüngen. Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung (D): nach Durchbrechen der Zellmembran erhält man die Whole-cell-Konfiguration. Dabei werden Membranfragmente und anderes Zellmaterial in die Nähe der Pipettenmündung gesaugt, was den Serienwiderstand  $R_s$  erhöht.  $R_m$  ist der Membranwiderstand,  $C_m$  die Kapazität der Membran. (nach: Numberger & Draguhn, 1996).

Zur Messung werden die Zellen zunächst in Suspension in eine Badlösung definierter Ionenkonzentration gebracht und es wird gewartet, bis die Zellen am Boden der Messkammer adhärirt haben. Dann wird eine Pipette, die mit einer ebenfalls definierten Pipettenlösung gefüllt ist und im Inneren eine Elektrode enthält, an die Zelle geführt und durch Anlegen eines leichten Unterdruckes die Zelloberfläche an die Pipettenöffnung gesogen. Dabei bildet sich ein fester Kontakt zwischen der Pipette und der Zellmembran („Cell-attached“-Konfiguration, s. Abb.4.3.B), der durch einen hohen elektrischen

Widerstand im Gigaohm-Bereich gekennzeichnet ist („Gigaseal“). Anschließend durchbricht man den Membranbereich („Patch“) unter der Pipette durch kurzes, kräftigeres Saugen und erhält so eine direkte Verbindung des Zytoplasmas mit der Pipettenlösung, die Ganzzellkonfiguration (s. Abb.4.3.C). Nach kurzer Zeit tauscht sich das Zytoplasma mit der Pipettenlösung aus und die Zusammensetzung des Zellinnern entspricht weitgehend der Pipettenlösung und ist damit klar definierbar, jedoch nicht mehr natürlich. Auf das Anlegen einer Kommandospannung an die Zellmembran reagiert die Zelle mit einer Stromantwort. Bei Spannungssprüngen treten kurzzeitige kapazitive Ladeströme zur Umladung der Zellmembran auf, die kapazitiven Transiente (s. Abb.4.3C). Über die Ableitelektrode wird der Stromkreis geschlossen und über einen Verstärker mit Steuereinheit und Filter werden die Stromantworten als Spannungssignale an den Computer weitergeleitet und dort zur Weiterverarbeitung gespeichert (s. Abb.4.3.D). Für eine detaillierte Beschreibung der Whole-cell Patch-Clamp Technik sei hier verwiesen auf Numberger & Draguhn (1996).

#### 4.7.2 Durchführung

Alle elektrophysiologischen Messungen und die dazugehörige Zellkultur wurden im Institut für Physiologie der Universität Rostock durchgeführt. Zunächst wurden hLEZ unter den üblichen Bedingungen (ca. 14 Tage in Kollagen-I-beschichteten ( $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 24-Lochplatten (Greiner) in DMEM (Gibco) mit 10% FCS (Gibco), 1% Gentamicin (Sigma) und 1% Bufferall (Sigma) kultiviert und unmittelbar vor Versuchsbeginn enzymatisch mit Accutase dissoziiert (PAA). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (20-23°C) vorgenommen. Dazu wurde eine in der Institutswerkstatt angefertigte dreikammerige Messkammer auf den Tisch eines inversen Lichtmikroskops (Nikon TMS mit Nikon-Objektivausstattung 10x, 20x und 40x) montiert und mit Physiologischer Salzlösung (PSS) gefüllt. In die mittlere Perfusionskammer wurde die Zellsuspension vorsichtig einpipettiert und den Zellen ca. 15 Minuten Zeit zum Sedimentieren und leichtem Adhären geben, damit sie während der Messung stabil an der Elektrode bleiben und der Elektrode beim Herstellen der Elektrodenverbindung nicht entgleiten. Von den äußeren zwei Kammern diente je eine als Zulauf- und eine als Absaugkammer. Von dort führten Silikonschläuche über eine Peristaltikpumpe zum Vorratsgefäß und zum Auffanggefäß. Auf diese Weise konnten die Lösungen kontrolliert ausgetauscht werden und die Zellen jeweils mit Kontroll- oder Testlösungen umströmt werden. Die mittlere Austauschzeit betrug dabei 2½ Minuten.

Die Patch-Pipetten wurden aus mittelhartem Borsilikatglas (Kwik File™ M 1B 150 F-6 Lot. 0309328, World Precision Instruments) an einem Narishige Model PC-10 Mikropipetten-Ziehgerät (Micropipette Puller) in zwei Schritten gezogen und besaßen im gefüllten Zustand Widerstände von 3-6 MΩ. Die Pipette wurde mit einem Mikromanipulator an die Zelle navigiert (MW Ser.Nr. 99621). Es wurde mit einem L/M-EPC-7 Vorverstärker und einem L/M-EPC-7 Hauptverstärker (beide HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) gearbeitet.

Die registrierten Signale wurden bei 2 kHz Tiefpass-gefiltert und durch die AXOLAB 1100 Hardware und einen Mikrocomputer (Compaq Deskpro 386/25m) in Verbindung mit der pCLAMP 5.5 Software (alle Axon Instruments) bei 10 kHz digitalisiert. Für Gesamtstrom-Messungen wurde als Badlösung  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige PSS in Kombination mit kaliumreicher Pipettenlösung verwendet. Zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom-Registrierung wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige PSS und cäsiumreiche Pipettenlösung kombiniert, d.h.  $\text{K}^+$  in der Pipettenlösung durch äquimolares  $\text{Cs}^+$  ausgetauscht, um die kleinen, kurzzeitigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme besser sichtbar zu machen. Das wird dadurch erreicht, dass Kaliumkanäle eine hohe Selektivität für Kalium-Ionen gegenüber anderen Kationen zeigen und durch zytosolisches  $\text{Cs}^+$  blockiert werden. Durch die Unterdrückung des Kaliumstroms wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom besser messbar. Eine vollständige  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom-Blockierung durch abschließende Zugabe von 0,5 mM Cadmium diente zur Darstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom-unabhängigen Ionenströme.

Wenn nicht extra angegeben, wurde der Cadmium-resistente Strom (Leck- und Hintergrundstrom) nicht von den einzelnen Stromaufzeichnungen oder den Strom-Spannungs-Beziehungen subtrahiert. Der in Cadmium-Anwesenheit erhaltene Strom wurde nur für die Kalkulation des Mibefradil-Effektes auf den Kalzium-Strom digital vom Gesamtstrom subtrahiert, um den durch Mibefradil inhibierbaren Anteil des spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromes isoliert von den übrigen, größeren Strömen messen zu können. Insgesamt wurden 25 Zellen erfolgreich gemessen. Kontinuierliche Stromableitungen mit einer Dauer von mindestens 30 min waren davon an 11 Zellen möglich. Als Testsubstanz zur Identifizierung des Kaliumstromes wurde der Kaliumkanalblocker Tetraethylammoniumchlorid (TEA) verwendet. Der T-Kanal-Blocker Mibefradil wurde als Stammlösung  $10^{-3}$  M in Wasser angesetzt. Die Weiterverdünnung erfolgte in PSS.

## Messprotokolle

Den untersuchten Zellen wurden durch Anlegen einer Kommandospannung gewünschte Membranpotentialwerte vorgegeben: sie wurden auf bestimmte Haltepotential-Werte



„geklemmt“. Von diesem Haltepotential ausgehend, wurden verschiedene Testspannungsimpulse in Form von Spannungssprungprotokollen (Darstellung s. Anhang) appliziert. Dazu wurde die Membranspannung in 14<sup>1)</sup> bzw. 16<sup>2)</sup> aufeinanderfolgenden Schritten auf zunehmend positivere Potentiale gesetzt. Die Messprotokolle 1a, 1b und 2 dienten zur Messung nicht-inaktivierender Ströme. Ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV (Messprotokoll 1a,b) bzw. -30 mV (Messprotokoll 2), wurden rechteckige Spannungspulse für die Dauer von 500 ms beginnend bei -100 mV (16 Episoden) bzw. -80 mV (bei 14 Episoden) bis zu +50 mV in 10 mV-Schritten appliziert. Die hiermit gemessenen Ströme konnten dann in der Datenauswertung von den im Messprogramm 3 registrierten Gesamtströmen subtrahiert werden, die gleichermaßen inaktivierende und nicht-inaktivierende Ionenströme durch die Zellmembran umfassen. Dieses Verfahren ermöglicht die Isolierung inaktivierender Stromkomponenten. Messprotokoll 3 stellt aufgrund starker Spannungsgradienten das für die Zelle strapaziöseste Programm dar. Deshalb wurde es im Programmablauf während der Messungen jeweils als letztes getestet. Es gliedert sich in drei Phasen: Vorpuls, Spannungsschritte und Nachpuls. Zunächst erfolgte eine rasche Hyperpolarisation zur Aufhebung der Ionenkanal-Inaktivierung durch einen 100 ms langen Vorpuls vom Haltepotential -60 mV auf -90 mV. Dann folgten analog zu den Messprotokollen 1 und 2 die Spannungssprünge für je 500 ms (beginnend bei -100 mV (16 Episoden) bzw. -80 mV (14 Episoden) bis zu +50 mV in 10 mV-Abständen, gefolgt von einem Nachpuls für 30 ms zu -90 mV. Dieser Nachpuls wurde eingesetzt, um zu sehen, bei welchem Potential sich der Strom direkt nach dem Zurückspringen in der Richtung umkehrt (Umkehrpotential). Dieser sogenannte tail-Strom gibt dann Auskunft über die Ionensorte, die am Strom beteiligt ist. (Für Kalium liegt das Umkehrpotential bei ca. -87 mV, deshalb wurde dieser zusätzliche Puls eingefügt). Des Weiteren ist es günstig, wenn das Haltepotential für den jeweiligen Testpuls identisch ist. Da die Zellen jedoch dauerhaft -90 mV nicht vertragen, wird dieser Wert durch einen kurzen Vorpuls vorgegeben (s.o.).

Die Messprotokolle wurden in der Reihenfolge Spannungssprungprotokoll 1, Protokoll 2 und abschließend Protokoll 3 absolviert.

## 4.8 Statistik

Für die Datenauswertung zur Analyse der Zellkontaktfläche von hLEZ sowie der Integrinexpression in HLE-B3 Zellen wurden das Tabellenkalkulationsprogramm

<sup>1)</sup> Messprotokoll 1a (akt500n), Messprotokoll 3a (akt500)

<sup>2)</sup> Messprotokoll 1b (akti500n), Messprotokoll 2 (akti500x), Messprotokoll 3b (akti500)

Microsoft EXCEL 7.0 (RRZN 1996) sowie die Statistik-Programme JMP® Version 3.2.1 (SAS Institute Inc. 1997) und SPSS Version 8.0 (Sweet 1998) verwendet.

Vor der Durchführung parametrischer Testverfahren wurden die Daten auf Normalverteilung und Varianzhomogenität geprüft. Wurden diese für parametrische Testverfahren geforderten Voraussetzungen nicht erfüllt, kamen nicht-parametrische Verfahren zur Anwendung. Im Text angegeben wurden jeweils Stichprobenumfang (n), Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und das Signifikanzniveau (p).

Im einzelnen wurden folgende statistische Verfahren genutzt:

1. Test auf Normalverteilung: Die zu testenden Daten wurden mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnoff-Testes auf Normalverteilung überprüft (Sachs 1997 S. 427ff.). Der Test wurde stets auf dem  $p \geq 0,10$ -Niveau durchgeführt. Geprüft wurde hier die Nullhypothese (die Stichprobe weist Normalverteilung auf) gegen die Alternativhypothese (die Stichprobe weist keine Normalverteilung auf). Sofern eine Normalverteilung der Daten und Varianzhomogenität zwischen den Gruppen vorlag, wurden im weiteren parametrische Testverfahren angewendet.

2. Test auf Varianzhomogenität: Zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen für unabhängige Stichproben innerhalb der Gruppen wurde der Test nach Levene (Sachs 1997 S. 349ff.) durchgeführt. Für unabhängige Stichproben wurde die Nullhypothese (gleiche Varianzen) gegen die Alternativhypothese (ungleiche Varianzen) getestet.

### 3. Mittelwertvergleiche:

Da für die bei der Zellkontaktflächenmessung in hLEZ erhaltenen Daten die Voraussetzungen für parametrische Testverfahren nicht erfüllt wurden, kam zur Überprüfung der Mittelwerte zweier unverbundener Stichproben der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz (Sachs 1997 S. 380ff).

Für den Mittelwertvergleich der zur Integrinexpression in HLE-B3 Zellen erhaltenen Daten wurde nach Erfüllung der Kriterien Normalverteilung und Varianzhomogenität der T-Test für ungepaarte Stichproben verwendet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Phänotypische Charakterisierung primärer humaner Linsenepithelzellen

#### 5.1.1 Morphologie

Wie die lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abb.5.1 zeigen, beginnen die auf dem Kapselsackexplantat verbliebenen hLEZ innerhalb weniger Tage nach In-Kulturnahme vom Explantat auf den Kulturschalenboden zu proliferieren. Diese proliferierenden Zellen bilden bei fortschreitender Kulturdauer, in der Regel nach 7-14 d, einen geschlossenen hofartigen Monolayer um das Explantat. Dessen explantatnah gelegene Zellen bilden annähernd dasselbe Bild wie die auf dem Kapselsack verbliebenen ursprünglich vorhandenen LEZ (s. Abb.5.2 A). So liegen die Zellen ebenfalls eng zusammen und besitzen oft eine wabenartige Gestalt. Die Zellgröße ist noch recht einheitlich, wohingegen die weiter auf das Deckglas proliferierten Zellen zu unregelmäßigeren Formen neigen, häufig Lamellipodien und Pseudopodien ausbilden und sich in subkonfluenten Bereichen eher langgestreckt (s. Abb.5.2 B) und zur Randlage hin erheblich vergrößert zeigen (s. Abb.5.2 C).

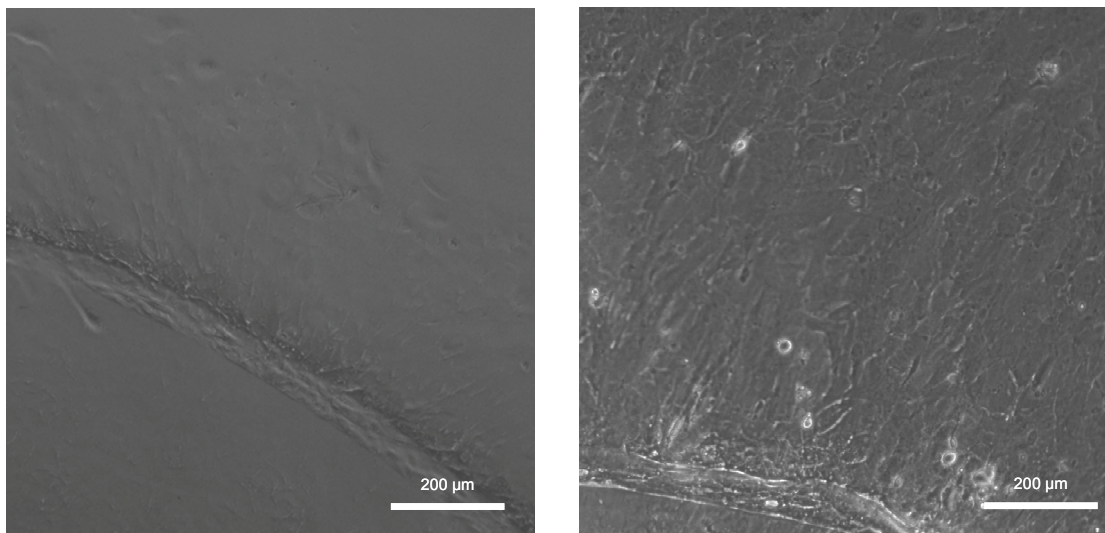


Abb.5.1. hLEZ-Proliferation vom Kapselsackexplantat (links 4 Tage, rechts 11 d in Kultur, Lichtmikroskopie).

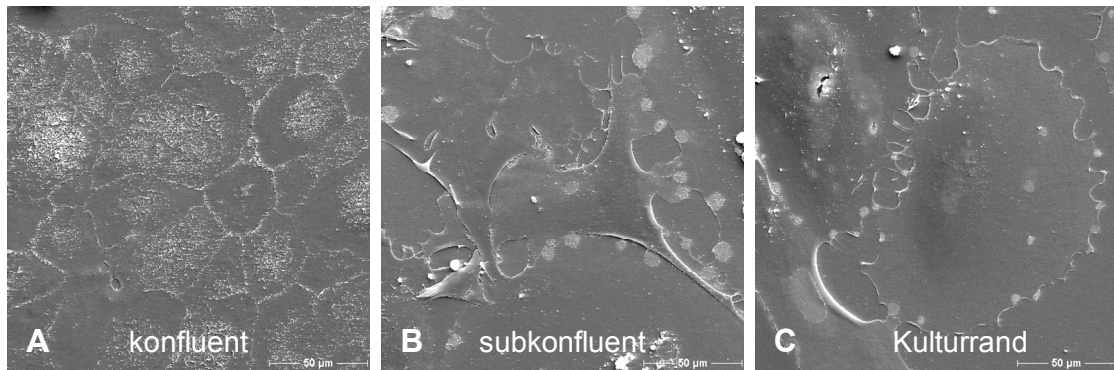


Abb.5.2. Morphologie von hLEZ auf dem Deckglas (9 Tage Kultur) in Abhängigkeit von der Lage zum Kapselackexplantat (Rasterelektronenmikroskopie, Bar: 50µm). Abnahme von Zelldichte und Konfluenzgrad bei Zunahme der maximalen Zelllänge und -breite mit zunehmender Entfernung vom Kapselsack. Lage der Zellen: A) konfluente ausgewachsene hLEZ in Kapselsacknähe auf dem Deckglas, B) subkonfluente ausgewachsene hLEZ in halber Distanz zwischen Kapselsack und äußersten, vom Kapselsack auf das Deckglas ausgewachsenen hLEZ, C) äußerst gelegene ausgewachsene hLEZ (Kulturrand).

### 5.1.2 Extrazelluläre Matrixproteine

Da die in vivo für den Nachstar verantwortlichen LEZ eine veränderte Zusammensetzung synthetisierter extrazellulärer Matrixproteine aufweisen, wurde die Synthese von Kollagen I, II, IV, Fibronectin und Laminin in hLEZ durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung untersucht. Diese Matrixkomponenten wurden bei ausgeprägtem Nachstar in Linsenepithelzellen nachgewiesen (s. Tab.2.1). Zudem sollen diejenigen Matrixproteine, die signifikant sezerniert werden, nach Abschluss der Phänotyp-Charakterisierung als ein Testparameter zur Erfassung zellulärer Auswirkungen des Kalziumkanal-Blockers Mibefradil dienen.

Alle untersuchten Matrixproteine werden in hLEZ synthetisiert und sind granulär im Zytoplasma lokalisierbar, wobei sie sich besonders im perinukleären Raum konzentrieren (s. Abb.5.3). Die individuelle Schwankungsbreite in der Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen ist für Laminin eher gering, während im Fall der übrigen Matrixproteine einzelne sehr stark fluoreszierende Zellen umgeben von einer Mehrheit von Zellen mit mittlerem Signalniveau erkennbar sind. Die Laminin-Sekretion ist besonders intensiv im Zellkern-nahen Bereich konzentriert.

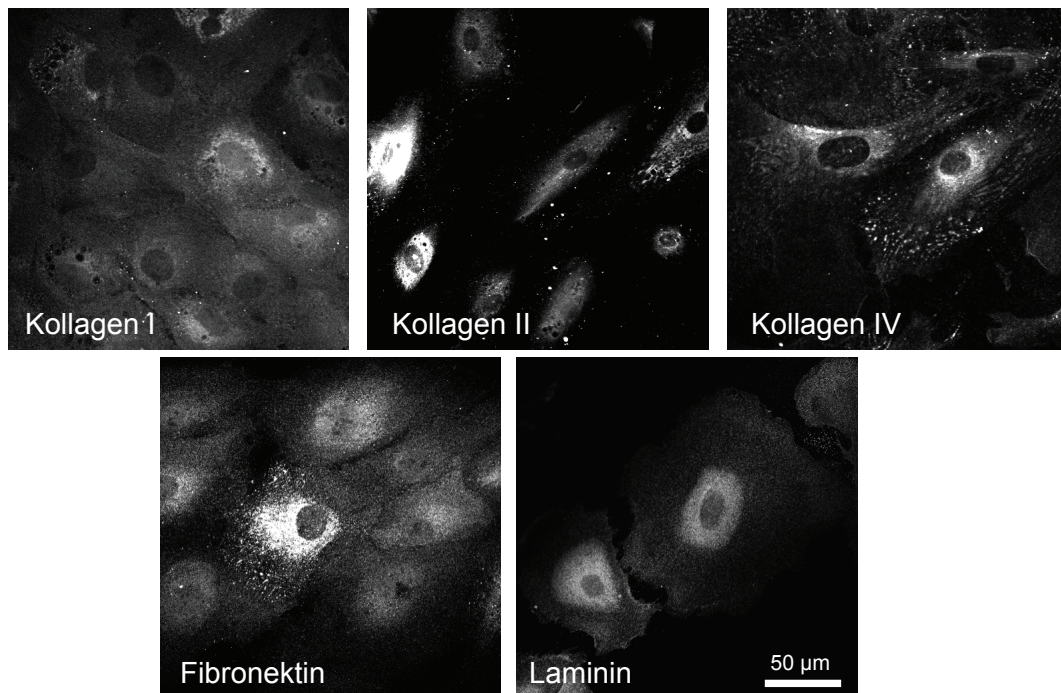


Abb.5.3. Fluoreszenzmikroskopischer Synthesenachweis extrazellulärer Matrixproteine (Kollagen I, II, IV, Fibronectin und Laminin) in hLEZ (Indirekter Immfluoreszenz-Nachweis, alle Einzelbilder haben die gleiche Vergrößerung). hLEZ sind positiv für Kollagen I, II, IV, Fibronectin und Laminin, wobei individuelle Unterschiede im Grad der Fluoreszenzintensität auftreten. Die nachgewiesenen Matrixproteine liegen granulär im Zytoplasma verteilt vor, mit besonderer Verdichtung um den Zellkern.

### 5.1.3 Vergleich des Aktin-Zytoskeletts in hLEZ und HLE-B3 Zellen

Die immunzytochemische Analyse der Aktin-Zytoskelettstruktur in hLEZ soll zur Einschätzung beitragen, inwieweit die hLEZ in Kultur dem ursprünglichen epithelialen Phänotyp mit subkortikalem Aktinnetzwerk entsprechen.

Unter subkonfluenten Bedingungen weisen benachbarte hLEZ oft gegensätzliche Aktin-Organisationsmuster auf (s. Abb.5.4 B). Kleinere, zu rundlichen Formen neigende hLEZ besitzen ein überwiegend epitheltypisch peripher angeordnetes F-Aktingerüst. Eher langgestreckte Zellen zeigen dagegen lange zelldurchspannende Stressfasern. In Zellen der Linsenepithelzelllinie HLE-B3 hingegen sind die Aktinfilamente im Verhältnis zur Zellgröße viel kürzer und durchziehen beinahe den gesamten Zellraum außerhalb des Zellkerns (s. Abb.5.4 A). Charakteristisch sind auch extrem kurze Aktinfilament-Bündel, die den Zellen ein stachelartig-bewehrtes Aussehen verleihen (s. Abb.5.4 C).

Aufgrund des Zytoskelett-Befundes in HLE-B3-Zellen wurde diese Zelllinie als nur bedingt geeignet eingestuft und daher ausschließlich für semiquantitative Versuche verwendet, für die die verfügbare Zellmenge primärer hLEZ nicht ausreichte.



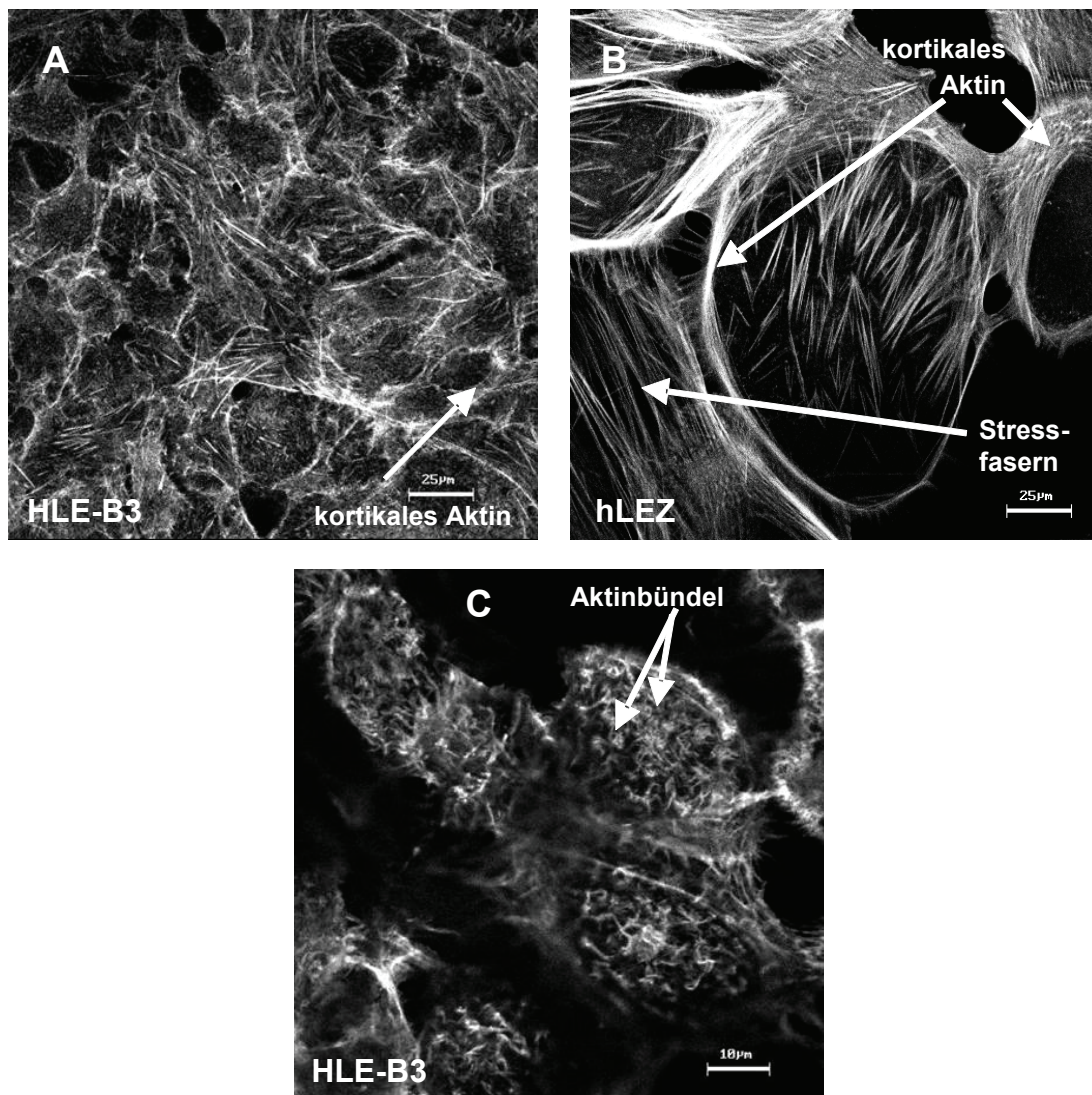


Abb.5.4. Anordnung des Aktin-Zytoskelettes in primären hLEZ (B) und in HLE-B3-Zellen (A, C), Fluoreszenzmikroskopie. In hLEZ sind sowohl subkortikal angeordnete Aktinfilamente als auch die Ausbildung von Stressfasern vertreten, während in HLE-B3 Zellen durch überwiegend sehr kurze Aktinfilamente charakterisiert sind.

#### 5.1.4 Expression von $\alpha$ -Smooth muscle actin

$\alpha$ -Smooth muscle actin kommt in glatten Muskelzellen vor und dient als ein spezifischer Marker dieser Zellen bei der Unterscheidung von Fibroblasten in Mischkulturen. Vorübergehend wird  $\alpha$ -Smooth muscle actin auch bei der Wundheilung in durch Differenzierung aus Fibroblasten hervorgegangenen Myofibroblasten gebildet. Fibroblasten dagegen besitzen kein  $\alpha$ -Smooth muscle actin. Diese  $\alpha$ -Aktin-Isoform wurde als Kriterium zur phänotypischen Beurteilung der postoperativ auswachsenden Linsenepithelzellen herangezogen, um im Fall eines positiven Testergebnisses

Hinweise auf eine mögliche Transdifferenzierung zu Myofibroblasten zu erhalten. Eine solche Umwandlung wäre nach der operativen Entnahme infolge der Gewebeverletzung zu erwarten.

Immunzytochemisch lässt sich  $\alpha$ -SMA in der Mehrzahl von humanen Linsenepithelzellen nachweisen (Abb.5.5). Besonders ausgedehnte, flache Zellen enthalten zahlreiche zarte Fasern aus glattmuskulärem Aktin. Unter den  $\alpha$ -SMA-negativen hLEZ dominieren Zellen mit kleinerem Zelldurchmesser und eher kompakter Form.

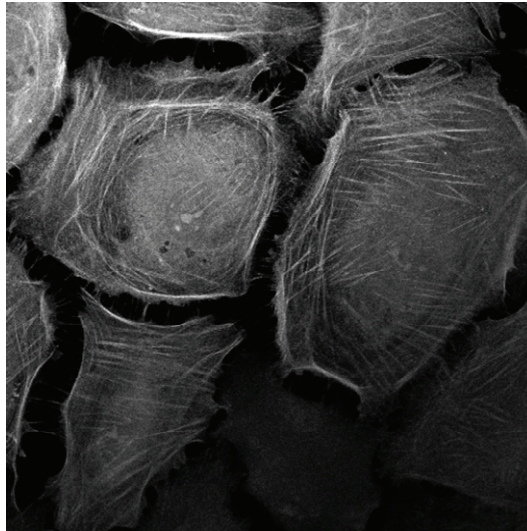


Abb.5.5. Ausprägung von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) in unbehandelten hLEZ (Fluoreszenzmikroskopie). Die Mehrzahl der Zellen weist filamentöses  $\alpha$ -SMA auf.

#### 5.1.5 Zell-Zell-Verbindungen am Beispiel der Tight Junctions (Zonulae occludentes)

Tight Junctions (Zonulae occludentes) sind besonders charakteristische Zell-Zell-Verbindungen zwischen Epithelzellen. Anhand dieser Merkmalsausprägung sollen Rückschlüsse auf den Differenzierungszustand der hLEZ gezogen werden.

Das Tight Junction-assoziierte Protein Zonula occludens-I (ZO-I) ist in konfluenten, auf dem Kapselsack befindlichen (mehr oder weniger als ruhend ansehbaren) hLEZ strikt in den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Abb.5.6 A). Eine schwache Anreicherung des Proteins im Zellkern ist in zahlreichen Zellen erkennbar. In den auswandernden, noch konfluenten hLEZ (kapselnaher Bereich, Abb.5.6 B) formiert sich ZO-1 ebenfalls saumartig entlang der Zell-Zell-Kontakte, jedoch erscheinen diese Säume breiter und leicht fransig. Gleichzeitig ist eine intensive Akkumulation im Zellkern anzutreffen. Mit zunehmender Entfernung vom Kapselsackexplantat hin zum Kulturrand ist dieses Protein kaum noch submembranös und nur schwach im Zytoplasma vorhanden



(Abb.5.6 C, D). Dafür ist ZO-1 in den Zellkernen nachweisbar, wenn auch weniger intensiv als im kapselnahen Populationsbereich. Diese Rückverlagerung ist ein Indiz für den EMT-assoziierten Verlust von Tight Junctions. In Übereinstimmung damit weisen im vorliegenden eigenen Versuch hLEZ in enger Nachbarschaft zum Kapselsackrand (Kapsulorhexis-Wunde) die stärkste nukleäre ZO-1 Akkumulation auf.

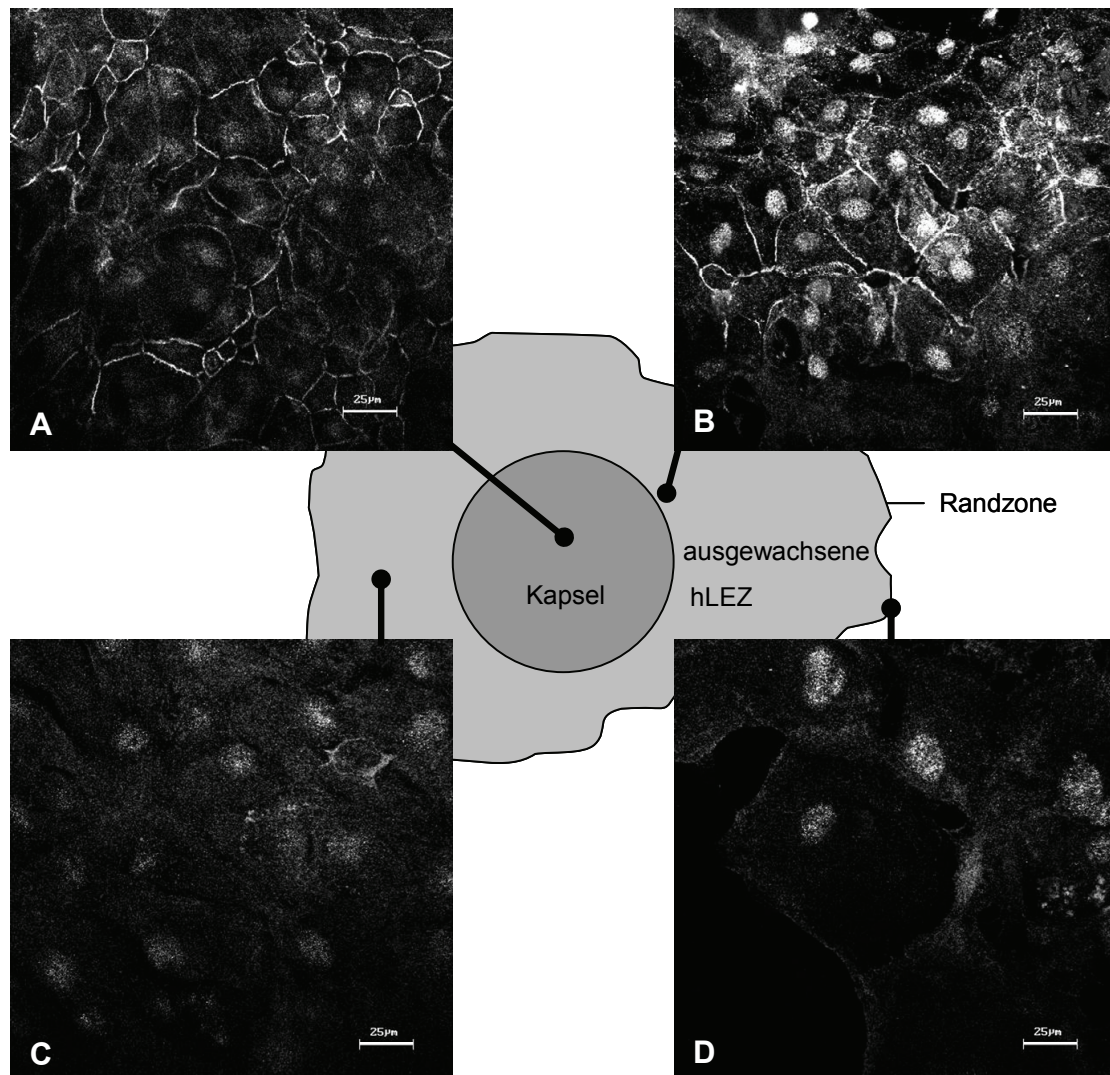


Abb.5.6. Verteilung des Tight junction-Proteins ZO-1 in kultivierten hLEZ (16 d Kultur), in Abhängigkeit von der Lage zum Linsenkapsel-Explantat (Fluoreszenzmikroskopie). Epitheltypische ZO-1-Lokalisation in konfluenten hLEZ auf der Linsenkapsel (A), dagegen bei ausgewachsenen hLEZ mit zunehmender Distanz zum Kapselexplantat fortschreitender Verlust der marginalen Verteilung (B-D). ZO-1 akkumuliert im Zellkern, besonders prominent in kapselnahen hLEZ.

Zur genaueren Zuordnung der aus Abb.5.6 ersichtlichen ZO-1-Verteilungsmuster in ausgewachsenen hLEZ zum epithelialen bzw. mesenchymalen Phänotyp wurde zum Vergleich auf gleiche Weise präparierte Zellen der Epithelzelllinie mHepR1 sowie primäre humane Fibroblasten herangezogen (s. Abb.5.7).



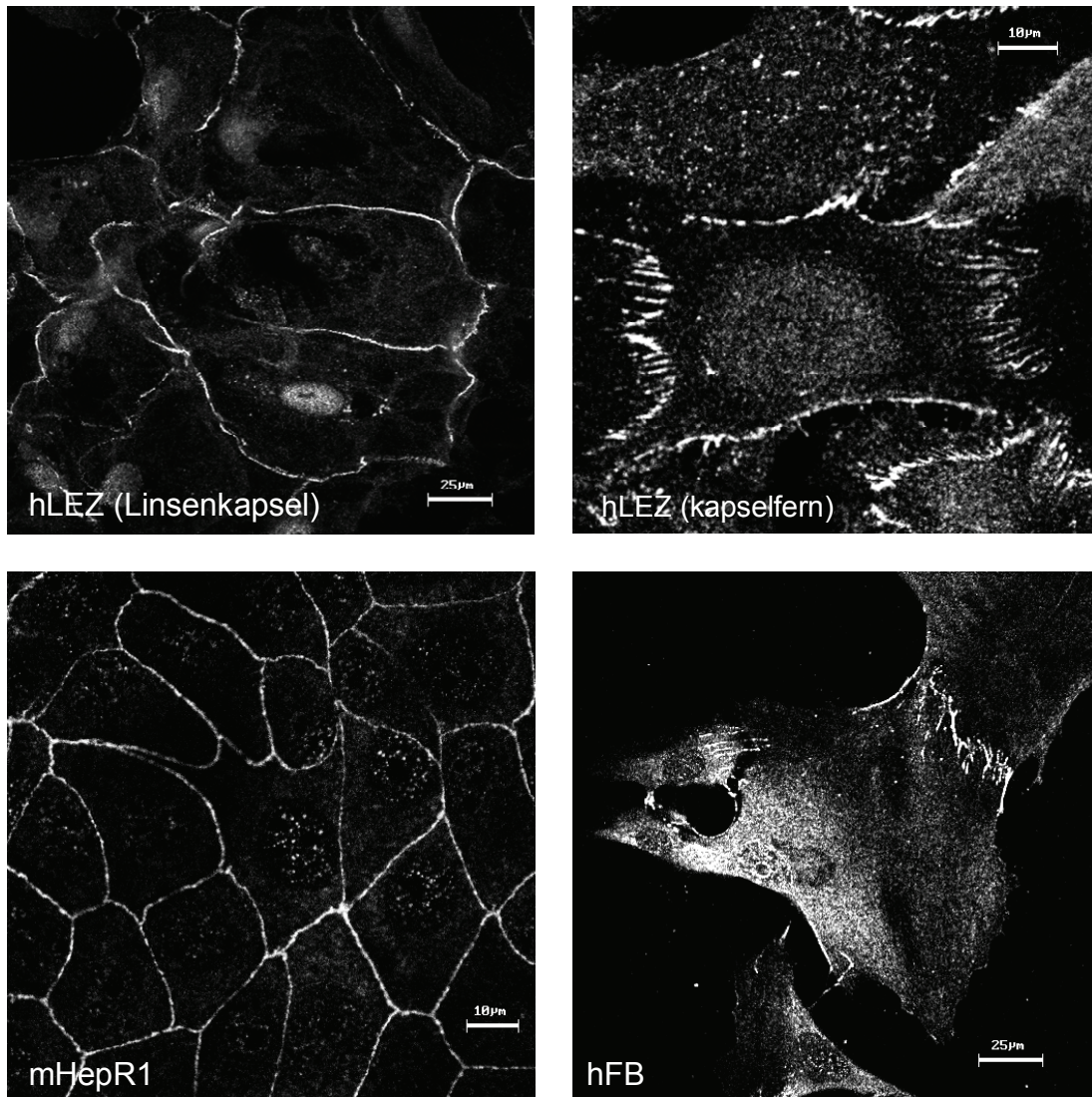


Abb.5.7. Expression und Verteilung des Tight Junction-assoziierten Proteins ZO-1 in verschiedenen Zelltypen. Membran-assoziierte ZO-1 Organisation entlang kontinuierlicher Tight Junction-Säume in epithelialen Zellen (mHepR1, hLEZ auf der Linsen kapsel) gegenüber vorrangig zytoplasmatischer ZO-1 Verteilung in mesenchymalen Zellen (primäre humane Fibroblasten (hFB), ausgewachsene, kapselfern gelegene hLEZ).

Epithelzellen (mHepR1, Abb.5.7) weisen geschlossene Tight Junction-Säume entlang ihrer lateralen Zellmembranen auf. Mesenchymale Zellen (primäre humane Fibroblasten) dagegen besitzen keine Tight Junction-Säume und ZO-1 lässt sich nur diskontinuierlich in Bereichen direkter Zell-Zell-Kontakte sowie im Zytoplasma nachweisen. Auf der Linsen kapsel befindliche hLEZ entsprechen aufgrund deutlich Membran-assoziiierter lateraler ZO-1-Säume weitgehend dem epithelialen Phänotyp. Kapselfern zur Randzone ausgewachsener Zellen hin gelegene hLEZ zeigen noch teilweise eine aufgelockerte ZO-1-Anordnung entlang lateraler Membranen an direkten Kontaktflächen zu Nachbarzellen sowie eine geringe Anreicherung im Zellkern. Die ZO-1-Konzentration im Zellkern nimmt mit zunehmender Entfernung zum Kapselsack

ab. Die in ausgewachsenen subkonfluenten hLEZ vorgefundene Anordnung des Tight Junction assoziierten Proteins ZO-1 spricht für eine Zwischenstellung der hLEZ zwischen epithelialem und mesenchymalem Phänotyp.

### 5.1.6 Integrin-Expression

Das Ergebnis der Durchflusszytometrie-Messung zeigt eindeutig eine Expression der Integrin-Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\alpha_3$ , während die übrigen getesteten Untereinheiten nur schwach ( $\alpha_2$ ) oder gar nicht ( $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ) nachgewiesen werden konnten (s. Abb.5.8.).

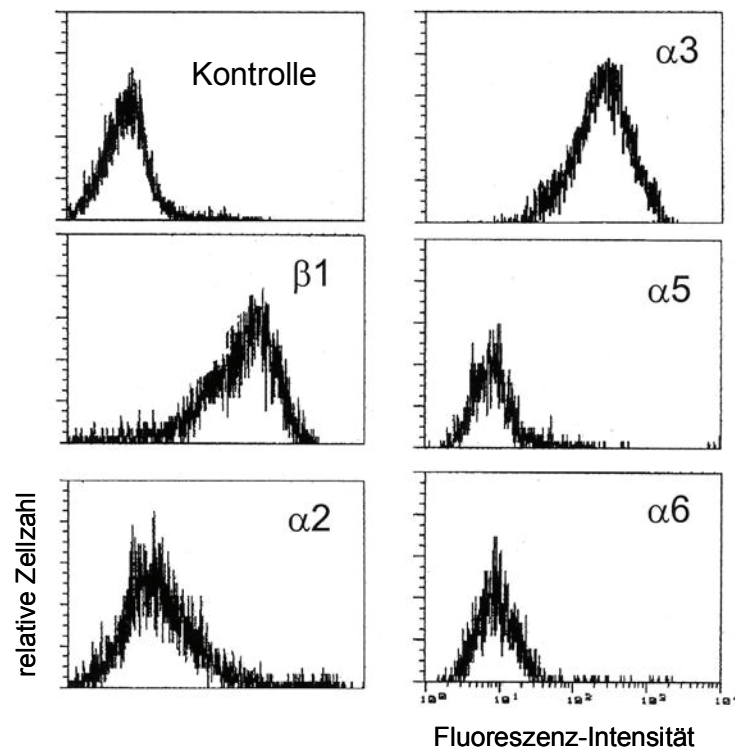


Abb.5.8. Flow-zytometrische Messung der Expression von Integrin-Untereinheiten in kultivierten primären humanen LEZ. Die Zellen exprimieren signifikant die Untereinheiten  $\alpha_3$  und  $\beta_1$ , während  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$  und  $\alpha_6$  nur sehr schwach bzw. nicht exprimiert werden.

### 5.1.7 Elektrophysiologische Bestimmung ausgewählter spannungsabhängiger Stromkomponenten von whole cell-Strömen in hLEZ

Inaktivierende und nicht-inaktivierende Ionenströme in kultivierten, primären hLEZ wurden im Voltage-clamp-Modus der Ganzzellableitung mit entsprechenden

Messprotokollen (1-3, s. Anhang) und unterschiedlichen Pipettenlösungen untersucht. Depolarisierende Spannungssprünge ergaben im Anschluss an den kapazitiven Transienten einen schnellen, einwärts gerichteten Stromfluß, der gefolgt wurde von auswärts gerichteten Strömen (Abb.5.9.A). Nach 10 ms war der Gesamtstrom dann auswärts gerichtet. Der auswärts gerichtete Strom dominierte dabei das Gesamtbild der inaktivierenden Ströme in  $K^+$ -reicher Pipettenlösung (Messprotokoll 3). Nicht-inaktivierende Ionenströme (Hintergrundströme) wurden im Messprotokoll 1 bzw. 2 erfasst (Abb.5.9.B, D). Diese wurden nicht weiter untersucht, da spannungsabhängige inaktivierende Ströme im Mittelpunkt des Interesses standen.

Der Auswärtsstrom besaß eine langsame Inaktivierungskinetik und erwies sich als sensitiv gegenüber dem selektiven  $K^+$ -Kanal-Blocker Tetraethylammonium-chlorid TEA (3 mM; nicht dargestellt). Aufgrund dieser Eigenschaften und der Größenordnung der Stromamplitude konnte dieser Strom als verzögert auswärts-gleichrichtender  $K^+$ -Strom charakterisiert werden. Der Ausstrom von  $K^+$ -Ionen nimmt in unstimulierten hLEZ den größten Anteil am gemessenen Gesamtstrom ein.

In  $Cs^+$ -reicher Pipettenlösung (Austausch von  $K^+$  durch äquimolare  $Cs^+$ -Konzentration zur Unterdrückung des großen  $K^+$ -Stroms und damit besseren Darstellung kleiner  $Ca^{2+}$ -Ströme) konnte bei Potentialen positiver als -60 mV ein schneller, unmittelbar nach dem kapazitiven Strom auftretender, wenige Millisekunden andauernder Einwärtsstrom registriert werden, der nach 2 ms sein Maximum erreichte und anschließend auf ein konstantes Niveau [steady current level] abfiel (Abb.5.9 C). Der Einwärtsstrom besaß eine Aktivierungsschwelle nahe -50 mV. Der Spitzenwert dieses Stroms mit ca. -100 pA trat bei -20 mV auf. Der Einwärtsstrom aktiviert und inaktiviert sehr rasch (ca. 10 ms Dauer). Das zeitliche und spannungsabhängige Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten sowie die Größenordnung des Stromes lassen auf das Vorliegen eines spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Stroms schließen. An verschiedenen Zellen ließen sich zwei in Kinetik, Aktivierungsschwelle und Strom-Spannungsbeziehung unterschiedliche Formen dieses Stroms messen (s. Abb.5.28). Diese Details sprechen für die Existenz entsprechender  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ und T-Typ, wobei der L-Typ in hLEZ im Gegensatz zum regelmäßig vorhandenen T-Typ nur sporadisch nachweisbar war (in <5% der gemessenen Zellen).

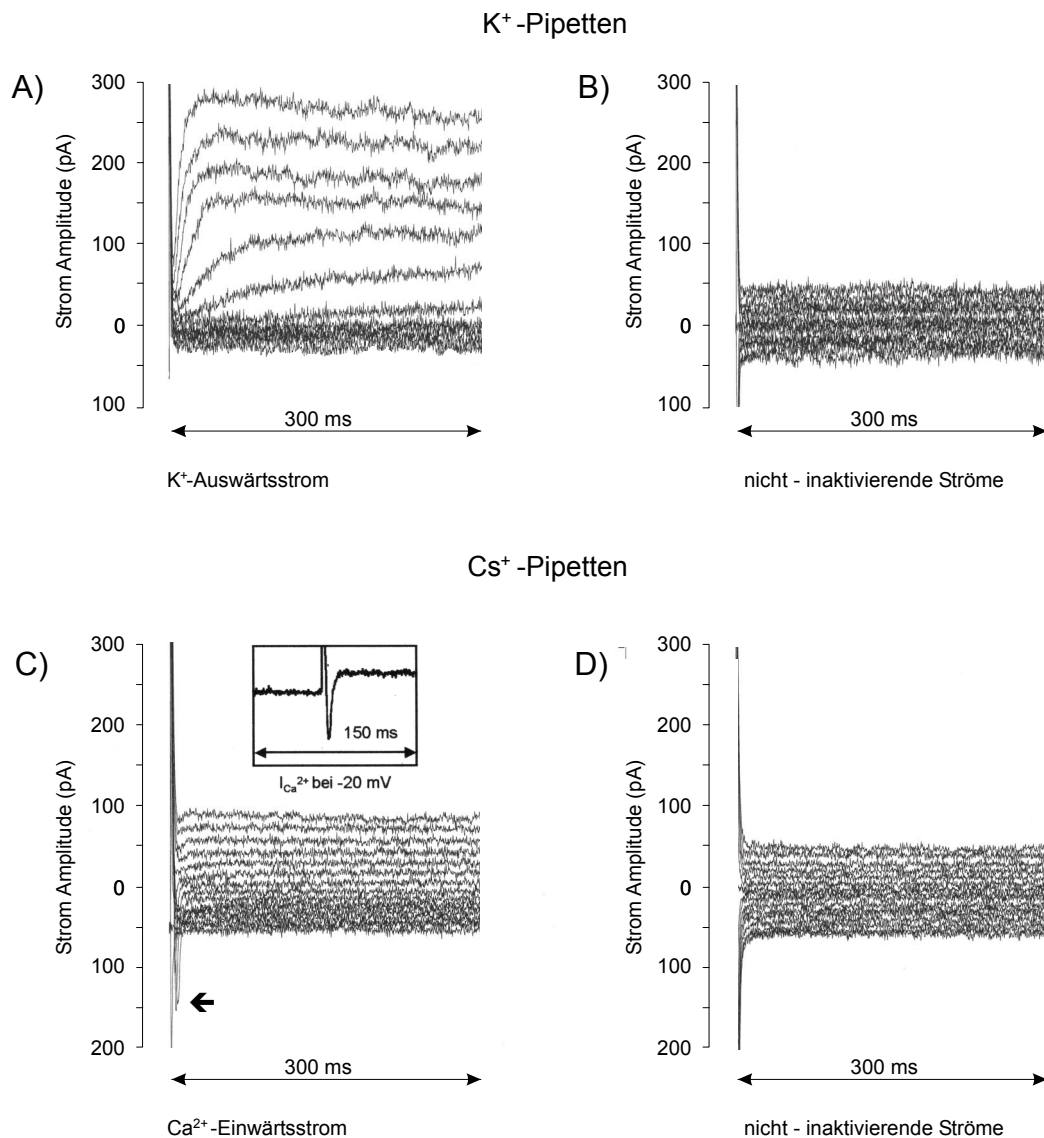


Abb.5.9. Elektrophysiologische Messung von Stromkomponenten des Gesamtstromes in kultivierten hLEZ (Beispiel, Patch clamp, whole-cell Konfiguration, n = 15). Abhängig von der Zusammensetzung der Pipettenlösung und den vorgegebenen Testspannungspulsen lassen sich von K<sup>+</sup>- bzw. Ca<sup>2+</sup>-Ionen getragene Ionenströme durch spannungsabhängige Ionenkanäle darstellen und inaktivierende Ionenströme (A, C) von nicht-inaktivierenden Strömen (B, D) trennen. In hLEZ sind ein spannungsabhängiger K<sup>+</sup>-Ausstrom (A) sowie ein spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Einstrom (C) nachweisbar. Inset in (C): vergrößerte Darstellung des Einwärtsstromes bei -20 mV Testspannung. Der linksgerichtete Pfeil in (C) zeigt auf den kurzzeitigen Einwärtsstrom, der unmittelbar auf den Testspannungspuls folgt.



## 5.2 Einfluss des T-Typ Kalziumkanal-Blockers Mibefradil auf das Adhäsionsverhalten humaner Linsenepithelzellen

### 5.2.1 Zellmorphologie primärer humaner LEZ

Der Kontakt der hLEZ mit dem ins Medium gegebenen Kalzium-Antagonisten Mibefradil führt bereits unmittelbar nach der Zugabe zu einer beginnenden Zellretraktion, die sich nach 24 h 10  $\mu\text{M}$  in einer Reduzierung adhärenter Zellen und Zellformänderungen (hin zu langgestreckt-schmal erscheinenden, zwischen Zellausläufern ausgespannten Zellkörpern) bei den noch überwiegend auf dem Kollagen I-Substrat haftenden Zellen manifestiert (Abb.5.10). Nach 48-stündiger Inkubation (10  $\mu\text{M}$ ) ist die Mehrheit der Zellen von der Unterlage abgelöst. Nach 24 h 20  $\mu\text{M}$  Mibefradil sowie allen darüber hinaus gehenden Inkubationszeiten bei sowohl 10 als auch 20  $\mu\text{M}$  Mibefradil befinden sich nur noch vereinzelt adhärente Zellen auf dem Deckglas. Diese verbliebenen hLEZ sind stark deformiert.

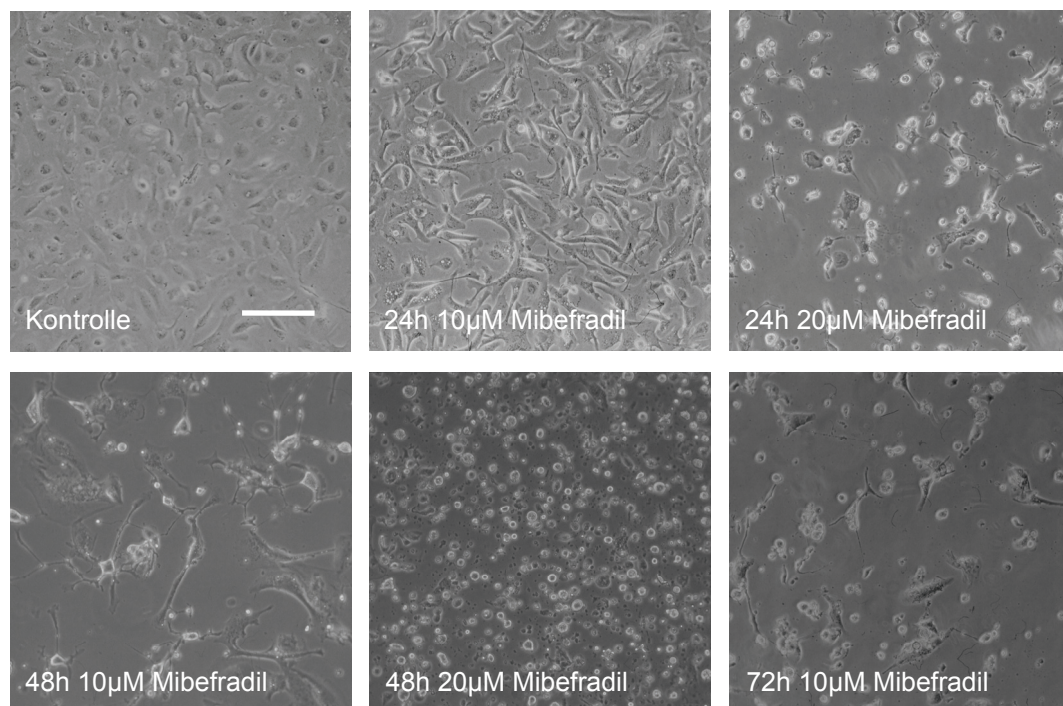


Abb.5.10. Morphologieänderung von hLEZ unter Mibefradil-Einfluss (Lichtmikroskopie, Bar: 200  $\mu\text{m}$ ). Nach 24 h 10  $\mu\text{M}$  Mibefradil starke Zellretraktion und Auftreten erster abgelöster Zellen. Nach 24 h 20  $\mu\text{M}$  sowie nach 48 h bzw. 72 h 10  $\mu\text{M}$  Mibefradil vollständiger Adhäsionsverlust bei der Zellmehrheit, vereinzelt adhärente Zellen verbleibend. Nach 48 h 20  $\mu\text{M}$  Mibefradil Adhäsionsverlust nahezu aller Zellen.

### 5.2.2 Änderung der Kontaktfläche von hLEZ unter Mibefradil-Einfluss

Bei subkonfluenten hLEZ führt schon eine kurze Inkubationszeit von 4 h mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Mibefradil zu einer signifikant (um 40%) reduzierten Projektionsfläche (Abb.5.11). Eine erste Verringerung um 11% ist dabei bereits nach 2 h bei gleicher Konzentration feststellbar. Nach 4 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Mibefradil ist diese Entwicklung deutlich fortgeschritten. Hier zeigen die vermessenen Zellen eine durchschnittliche Verringerung ihrer Kontaktfläche mit dem Substrat um 21%.

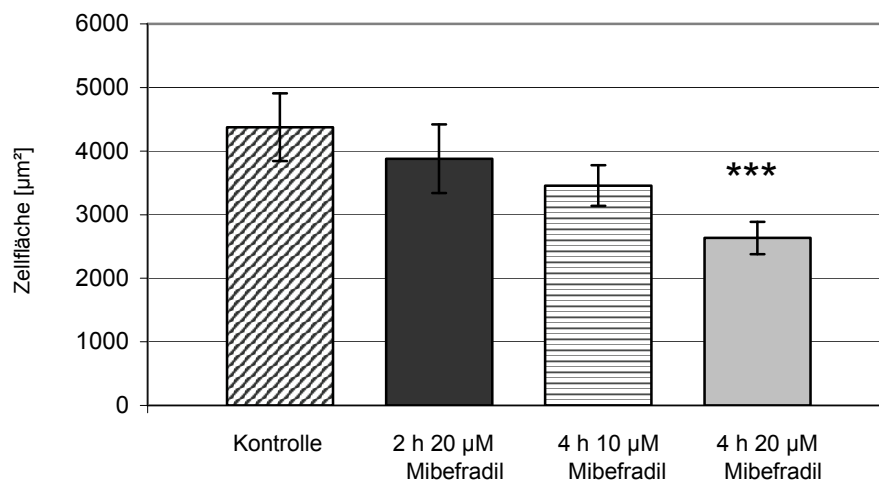


Abb.5.11. Einfluss von Mibefradil auf die Zellkontaktfläche von hLEZ. Angegeben sind MW  $\pm$  SD mit  $p < 0,001$  für  $n = 40$  (Mann-Whitney-U-Test). Dosisabhängige Verringerung der Zellkontaktfläche, signifikant für 4 h 20  $\mu\text{M}$  Mibefradil.

### 5.2.3 Expression des Tight junction Proteins ZO-1 in primären humanen LEZ

Ausgewachsene hLEZ wiesen gegenüber dem geschlossenen Monolayerverband auf dem Kapselsack eine stark aufgelockerte Verteilung des Tight junction Proteins ZO-1 in aneinandergrenzenden Zellmembranbereichen auf (s. Abschnitt Tight junction-Nachweis in hLEZ). Im Zuge der beobachteten Mibefradil-induzierten Zellretraktion und Adhäsionsverminderung (s. Abschnitt Morphologieänderung unter Mibefradil-Einfluss) ist eine Reduzierung der membranständigen ZO-1-Expression erwarten.

Diese Erwartung bestätigte sich, indem dosis- und zeitabhängig das Aufbrechen der Zell-Zell-Kontakten mit einem deutlichen Verlust des unter Normalbedingungen überwiegend dort organisierten Proteins einhergeht (s. Abb.5.12). Parallel dazu kommt

es zu einer Relokalisation in das Zytoplasma und kernnahe Bereiche. Ferner tritt bei der Langzeitinkubation (48 h) eine verstärkte Clusterung innerhalb des deformierten Zellkörpers auf.

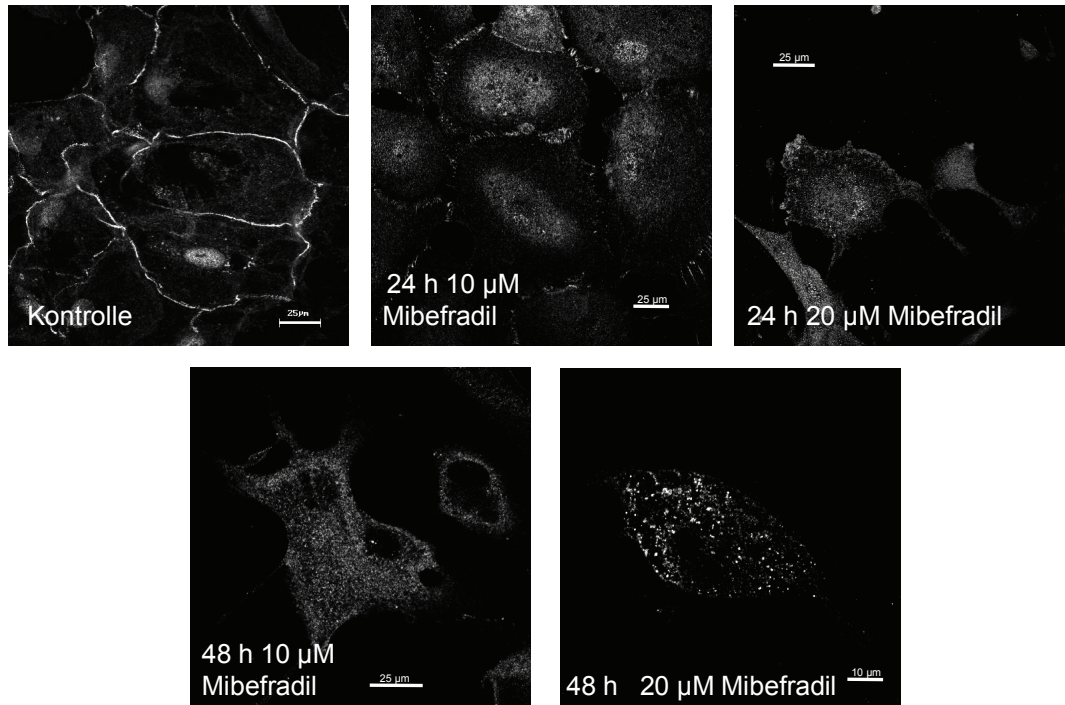


Abb.5.12. Änderung der Verteilung des Tight junction-assoziierten Proteins ZO-1 in hLEZ unter Mibefradil-Einfluß (Fluoreszenzmikroskopie). In konfluenten hLEZ liegt ZO-1 strikt submembranös und z.T. im Zellkern lokalisiert vor (Kontrolle). Zeit- und dosisabhängig erfolgt bei Inkubation der hLEZ mit Mibefradil eine Umverteilung von ZO-1 mit Dispersion im Zytoplasma (24 h 10 bzw. 20 µM Mibefradil) bis hin zur Konzentration in Clustern (48 h 10 µM und 20 µM Mibefradil).

#### 5.2.4 Integrinexpression von HLE-B3 Zellen

Das Expressionsmuster der Integrin-Untereinheiten und seine Änderung geben Aufschluss über die relative Anzahl an Adhäsionskontakten zur Extrazellulären Matrix und liefern Anhaltspunkte über eine Zellreaktion hinsichtlich der Regulation ihrer Adhäsionsrezeptoren.

Die flowzytometrische Erfassung von Integrin-Untereinheiten wurde aufgrund der erforderlichen Zellmenge an der humanen Linsenepithel-Zelllinie HLE-B3 vorgenommen (s. Abb.5.3). Mibefradil-Konzentrationen zwischen 5–15 µM bewirken keine signifikanten Veränderungen der Integrin-Expression (maximale Reduktion ca. 20%), während Dosen ab 20 µM zu einer signifikanten Reduzierung führen.

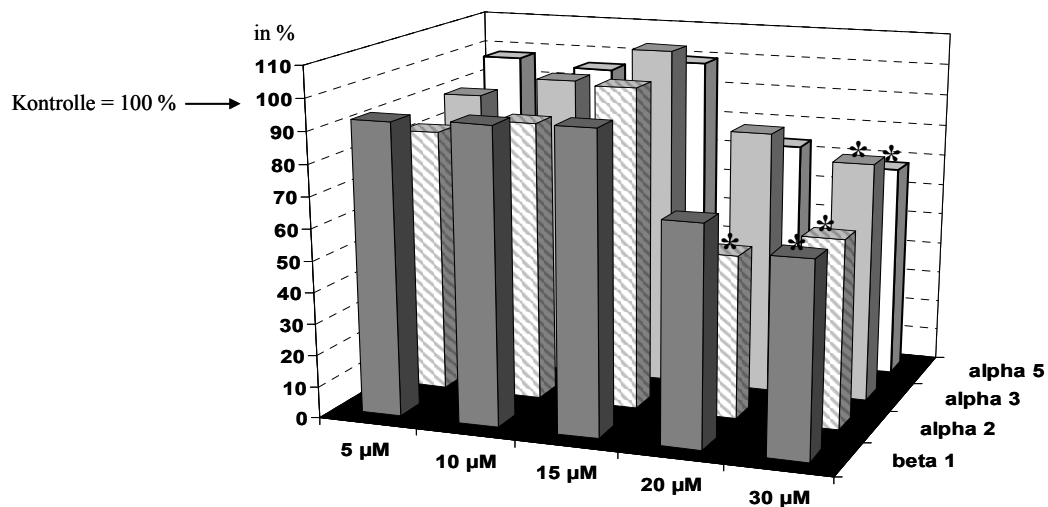


Abb.5.13. Änderung der Integrinexpression in HLE-B3-Zellen nach 24 h Inkubation mit 5-30 µM Mibefradil (in % zur Kontrolle; FACS-Analyse). Signifikanz: \*  $p < 0,01$  für beta1, alpha2, alpha3 bzw. \*  $p < 0,04$  für alpha5 (T-Test, ungepaart). Signifikante Reduzierung der Integrinexpression ab 24 h 20 µM Mibefradil-Einwirkung.

### 5.3 Einfluss des T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf die Zellmorphologie primärer Hornhautendothelzellen

Der Einsatz von Mibefradil zur Adhäsionsinhibition bei proliferierenden hLEZ setzt im Hinblick auf eine potentielle Eignung zur Nachstarprävention neben der Wirksamkeit das Ausbleiben von Schädigungen angrenzender Gewebe voraus. Die im menschlichen Auge sich in unmittelbarer Nachbarschaft befindenden und nach der Katarakt-OP durch das Kammerwasser frei zugänglichen Endothelzellen der Hornhaut (Cornea) dürfen nicht beeinträchtigt werden. Zur Simulation dieser Situation wurden humane Cornea-Explantate bis zu 7 d mit verschiedenen Mibefradil-Konzentrationen inkubiert (Abb.5.14, Abb.5.15). Geprüft werden sollte dabei die Hypothese, dass intakte Zellrasen (geschlossener Endothelzellverband) schwerer durch Mibefradil angreifbar sind als Einzelzellen (subkonfluente hLEZ in den bisher dargestellten Zellkulturversuchen). Dies wurde anhand der auf hLEZ adhäsionshemmend wirkenden Mibefradil-Konzentrationen 10 und 20 µM getestet (Abb.5.14). Nach 24h Inkubation mit 10 µM Mibefradil waren lichtmikroskopisch keine morphologischen Veränderungen erkennbar, während es bei 20 µM zu ersten stellenweisen Auflockerungen von Zell-Zell-Kontakten kam. Damit erwies sich der geschlossene Endothellayer als weniger sensitiv gegenüber Mibefradil als die kultivierten hLEZ. Im weiteren Versuchsverlauf traten bei beiden Konzentrationen nach 4 d erste Zellverluste und -deformierungen bei



der lichtmikroskopischen Beurteilung auf. Aufgrund der limitierten Projektlaufzeit und der seltenen Verfügbarkeit von Spender-Hornhäuten war innerhalb dieses Zeitraumes dieser Versuch nur als Einzelversuch möglich.

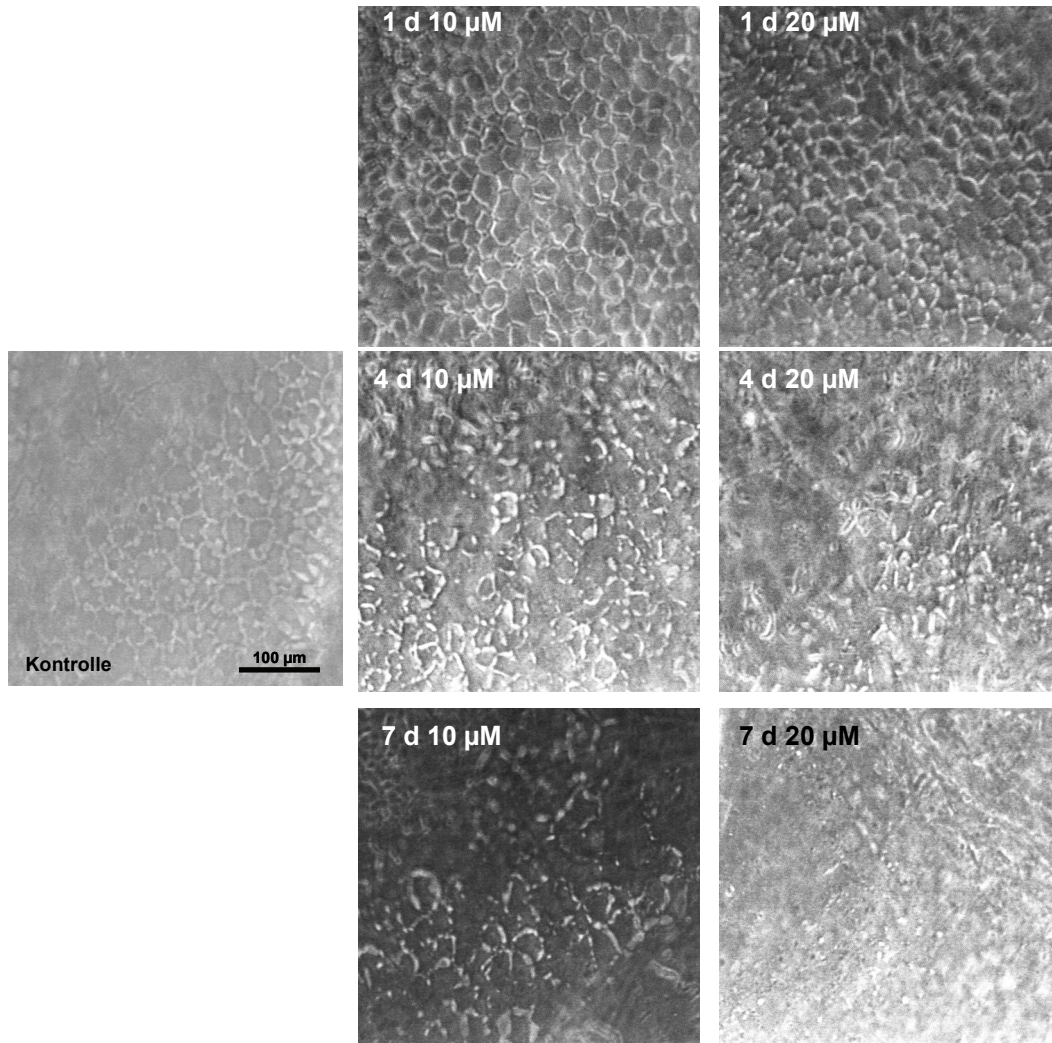


Abb.5.14. Mibefradil-induzierte Schädigung des Hornhautendothels im Cornea-Explantat: Dosisabhängigkeit (Lichtmikroskopischer Befund nach 1, 4 bzw. 7 d Mibefradil-Inkubation (Konzentration 10 und 20  $\mu\text{M}$ ). Vergrößerung für alle Einzelbilder identisch (s. Kontrolle).

Zur Ermittlung der Mibefradil-Konzentration, ab welcher der gesamte Hornhautendothelverband innerhalb von 24 h nachhaltig geschädigt wird, wurden Hornhautexplantate mit Testkonzentrationen, die für die Adhäsionsinhibition in hLEZ nicht relevant sind (30 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Mibefradil), inkubiert. Sowohl 30 als auch 50  $\mu\text{M}$  Mibefradil führten nach 24 h zur nahezu vollständigen und irreversiblen Zerstörung des Zelllayers.

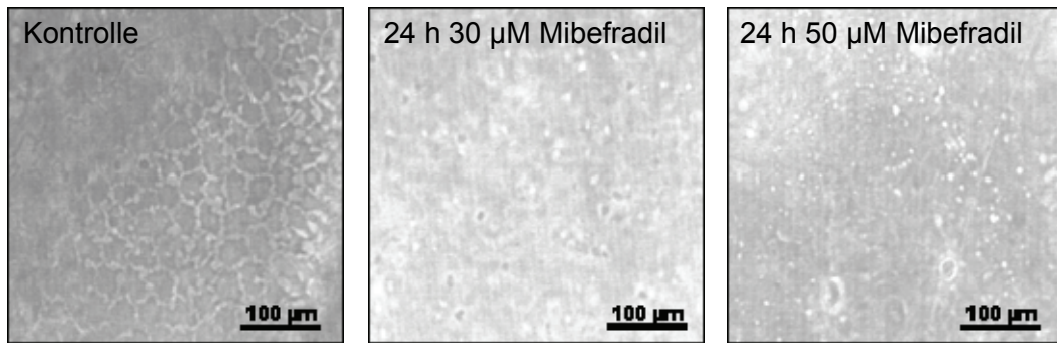


Abb.5.15. Mibefradil-induzierte irreversible Schädigung des Hornhautendothels infolge vollständiger Zelldissoziierung im Cornea-Explantat (Lichtmikroskopischer Befund nach 24 h Mibefradil-Inkubation (Konzentration 30 und 50  $\mu\text{M}$ )).

Um einen möglichen langfristigen Effekt einer einmaligen Mibefradileinwirkung auf das Hornhautendothel *in vivo* zu untersuchen, wurden Kaninchen-Hornhautexplantate (Entnahme 40 Tage nach der einmaligen Injektion von 10  $\mu\text{M}$  Mibefradil in die vordere Augenkammer) für die Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des Hornhautendothels präpariert. Die Auswertung ergab keine morphologische Beeinträchtigung der Hornhautendothelzellen (s. Abb. 5.16).



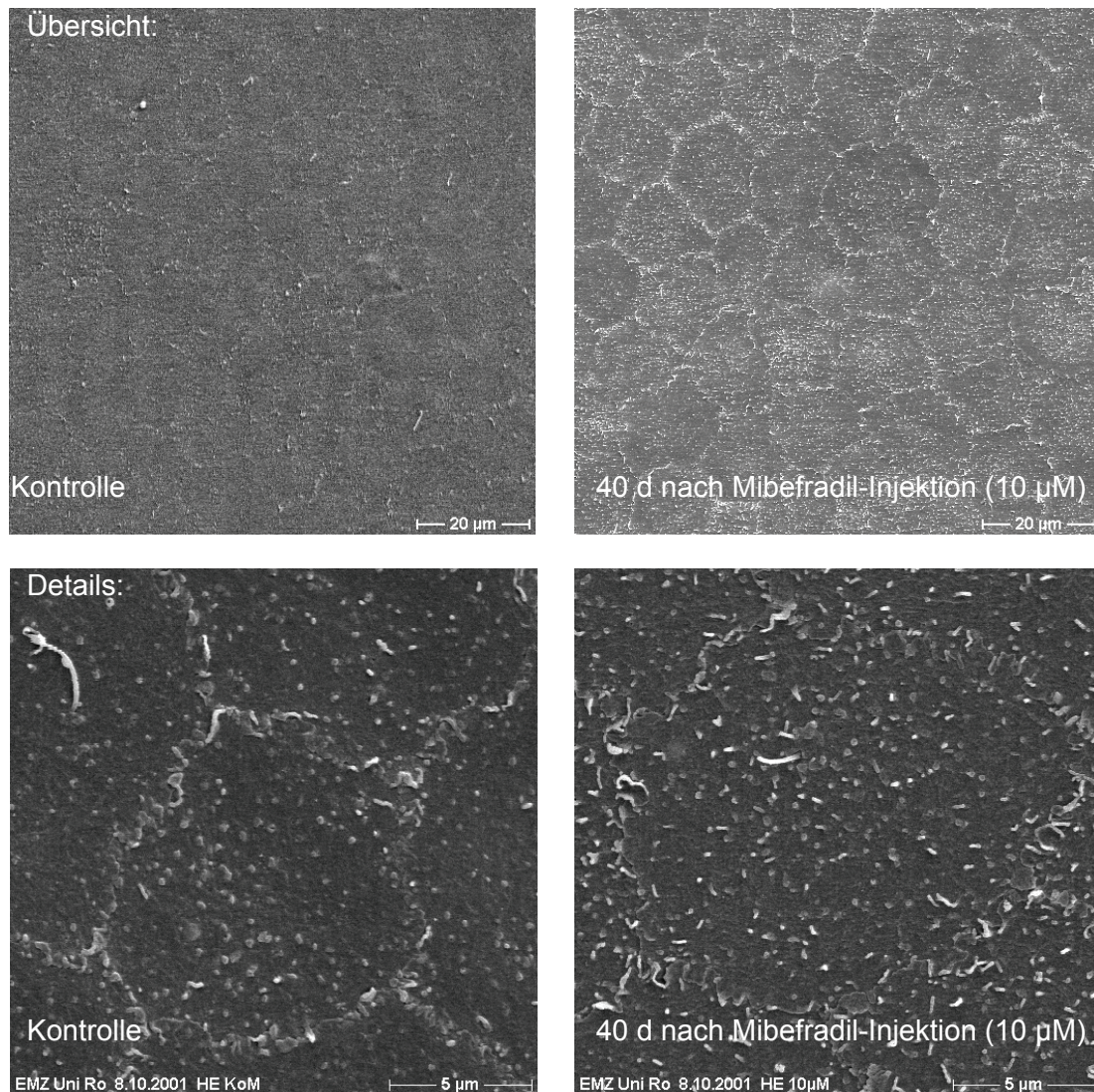


Abb.5.16. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Membranoberfläche von primären Kaninchen-Endothelzellen im natürlichen Zellverband (Cornea-Explantat 40 d nach einmaliger Mibefradil-Injektion (10 µM) in die vordere Augenkammer). Es waren keine morphologischen Veränderungen gegenüber der Kontrolle feststellbar.

#### 5.4 Einfluss des T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf die Streulichteigenschaften von HLE-B3 Zellen

Eine Änderung der Streulichteigenschaften, welche Zellgröße und –granularität charakterisieren, ließ sich flowzytometrisch an HLE-B3-Zellen nicht nachweisen (s. Abb.5.17). Dies deutet auf eine stabile Morphologie der HLE-B3-Zellen nach Inkubation mit Mibefradil und nachfolgender Trypsination hin.

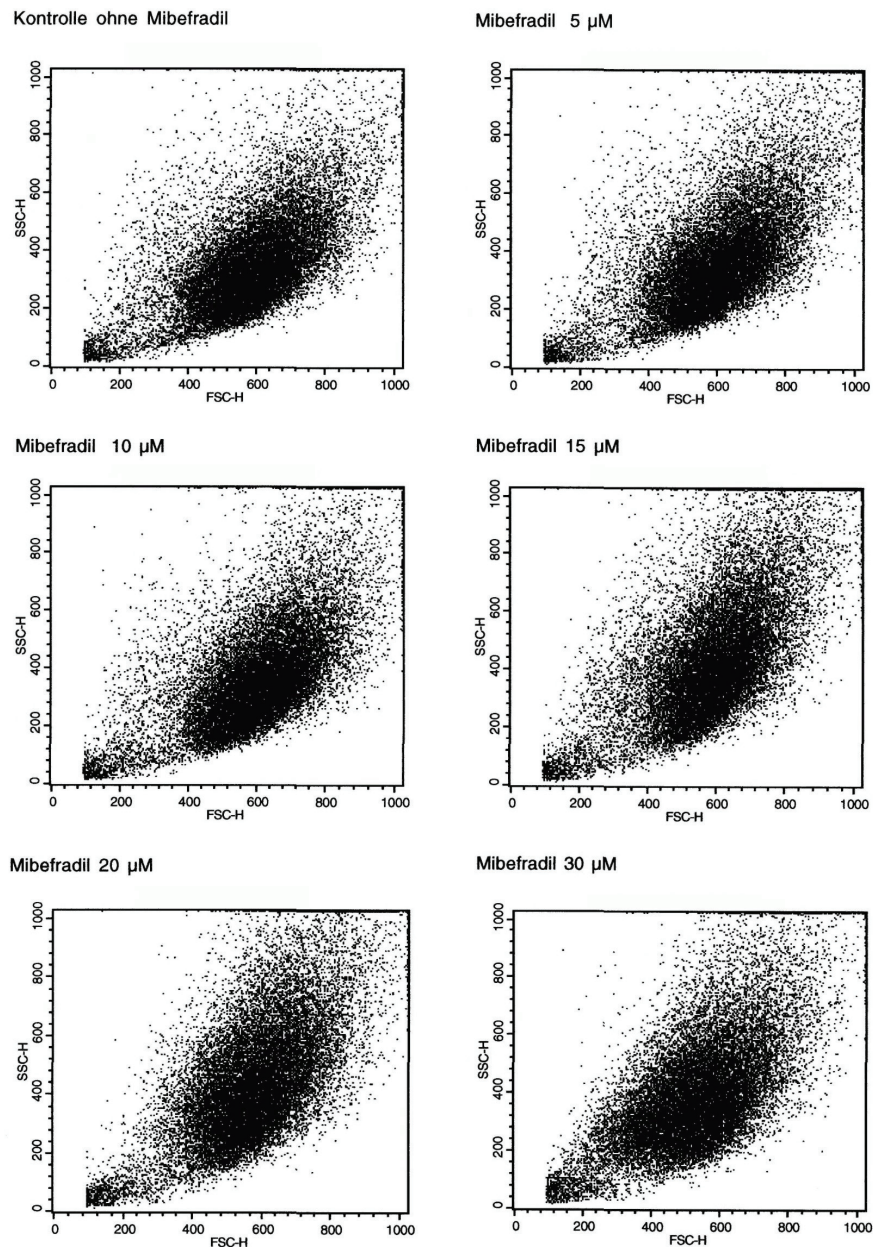


Abb.5.17. Streulichteigenschaften (FSC/SSC) von HLE-B3-Zellen nach 24 h Mibefradil-Inkubation (FACS-Analyse). Keine dosisabhängige Änderung der Streulichteigenschaften von HLE-B3 Zellen nach Inkubation mit 5 bis 30 µM Mibefradil nachweisbar.

## 5.5 Einfluss des T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine primärer hLEZ

In kultivierten primären hLEZ wird Kollagen I in hohem Maße und recht fein granuliert über die gesamte Zelle - mit Ausnahme des Zellkerns - verteilt, sezerniert (s.



Abb.5.18). Dabei lassen sich besonders perinukleär Syntheseanhäufungen feststellen. Nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Mibefradil ist die perinukleäre Konzentrierung weitgehend erhalten, jedoch erscheint das Kollagen in der Zellperipherie spärlicher verteilt. Dieser Effekt ist vor allem in den noch ausgebreiteten Zellen auffällig, während die Kollagenverteilung in den retrahierten, oft langgestreckten Zellen mit verringerter Kontaktfläche nicht verändert scheint. Gleichzeitig ist eine Verdichtung im Zellkernbereich zu erkennen. Einzelne Zellen weisen eine clusterförmige Kollagen I-Verteilung auf. Nach 24 h Einwirkung von 20  $\mu\text{M}$  Mibefradil sind intrazellulär große Cluster vorhanden, es gibt kein differenziertes Verteilungsbild mehr (Abb.5.18).

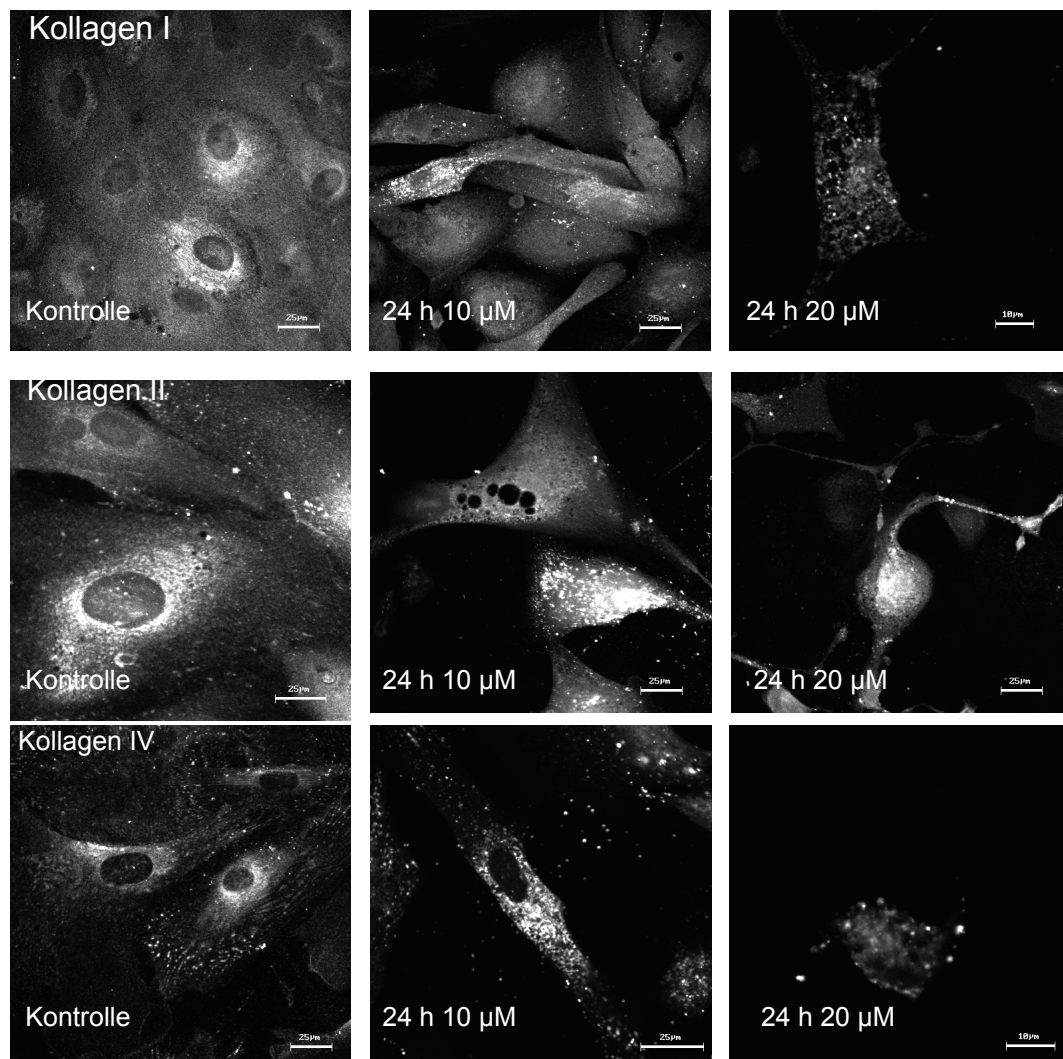


Abb.5.18. Erster Teil. Fortsetzung und Beschriftung siehe folgende Seite.

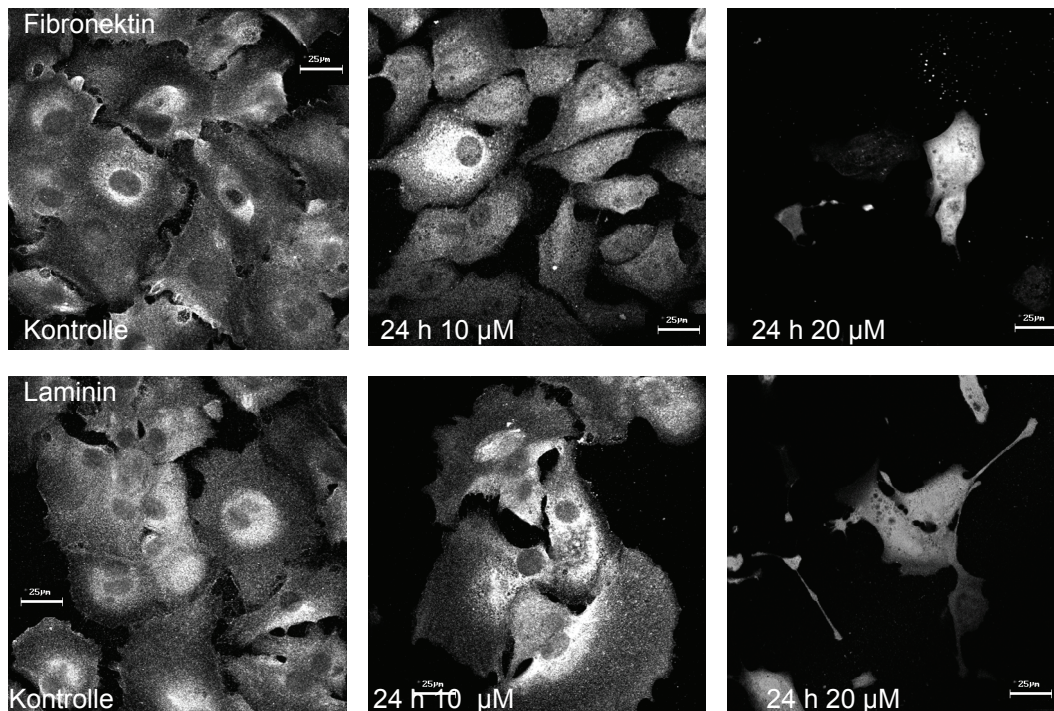


Abb.5.18. Einfluss von Mibefradil auf die Synthese von Kollagen I, II, IV, Fibronectin und Laminin in hLEZ. Indirekter Immunfluoreszenznachweis mit Alexa-488-markierten Sekundärantikörpern (Fluoreszenzmikroskopie, Bar 25 bzw 10µm). Die ursprünglich granuläre Verteilung der nachgewiesenen Kollagen-Typen wird durch Mibefradil weitgehend zugunsten einer Clusterung verändert. Fibronectin und Laminin dagegen bleiben granulär erhalten.

Das Ergebnis der Kollagen Typ II-Markierung unterscheidet sich kaum vom Erscheinungsbild des Kollagen Typs I. Auch hier überwiegen in der Kontrolle eine starke Konzentration im perinukleären Raum sowie eine Verteilung über das Zelllumen bis zur Plasmamembran, wobei die Verteilung hier nicht ganz so fein granuliert und homogen ausfällt wie die von Kollagen I. Die Zellen scheinen im Vergleich zu Kollagen I weniger Kollagen II zu produzieren. Ähnlich wie in Abb.5.3 tritt auch hier nach 24h 10 µM Mibefradil-Behandlung in einem Teil der Zellen eine unverändert granuläre Kollagen II-Verteilung auf. Gleichzeitig fallen einzelne Zellen mit clusterartig angeordnetem Kollagen II auf. Im Präparat 24 h 20 µM Mibefradil schließlich ist eine unspezifische Verteilung über den stark deformierten Zellkörper sichtbar.

Ebenfalls vorrangig im perinukleären Raum lokalisiert, aber im übrigen Zellbereich wesentlich schwächer und gröber aggregiert ausgeprägt, lässt sich das Erscheinungsbild von Kollagen IV im Kontrollpräparat beschreiben. Eintägige Mibefradil-Einwirkung (10 µM) zeigt das Cluster-Bild einer intensiven perinukleären Synthese und eine abgeschwächte bis kaum noch erkennbare periphere Verteilung. In den nach 24 h 20 µM Mibefradil-Inkubation noch vorhandenen adhären hLEZ lässt sich kein Unterschied zu Kollagen I und II feststellen. Auch hier sind auf dem Deckglas nur noch stark deformierte Zellen sowie Zellartefakte erhalten.

Unbehandelte hLEZ zeigen eine perinukleär konzentrierte Fibronektin-Verteilung in der Zelle. Nach 24 h 10  $\mu$ M Mibefradil ist ein Trend zu einer insgesamt leicht gesteigerten Fibronektin-Synthese erkennbar. Im 24 h 20  $\mu$ M Mibefradil-Präparat sind Fibronektin-negative Zellkörper neben schwach positiven und stark fluoreszierenden Zellen anzutreffen.

Laminin ähnelt in Kontrollzellen seinem Expressionsmuster der Fibronektin-Verteilung. Auch hier tritt es im Präparat um den Nukleus herum lokalisiert besonders intensiv auf und dünnt sich granuliert Richtung Zellmembran etwas aus. Zellen, die 24h mit 10 $\mu$ M Mibefradil inkubiert wurden, weisen teilweise eine leicht gesteigerte perinukleäre Laminin-Sekretion auf. Im 24h 20  $\mu$ M-Präparat lässt sich aufgrund der mäßigen uniformen Fluoreszenz in den deformierten Zellen keine differenzierte Laminin-Anordnung mehr ausmachen.

## 5.6 Untersuchungen zur Apoptose in humanen Linsenepithelzellen

### 5.6.1 Nachweis der Phosphatidylserin-Exposition auf der Zellmembranaussenseite von hLEZ und HLE-B3

Ein im Anfangsstadium der Apoptose auftretendes Ereignis ist die Exposition des im Normalzustand der Zelle ausschließlich auf der zytoplasmatischen Zellmembranseite vorkommenden Phospholipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zytoplasmamembran. Ein solcher Switch kann durch Fluoreszenzmarkierung mit Annexin-V-FITC nachgewiesen werden. In hLEZ ist nach kurzzeitiger Einwirkung von 20  $\mu$ M Mibefradil (2 bzw. 4 h) eine teilweise Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Membranaussenfläche zu beobachten (Abb.5.19).

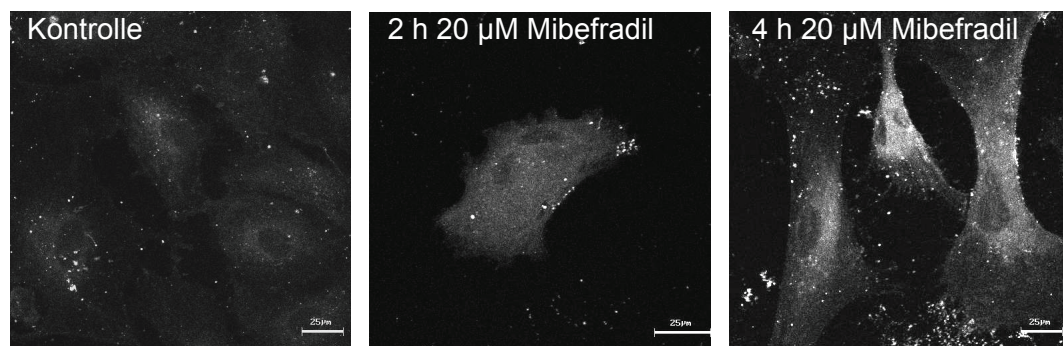
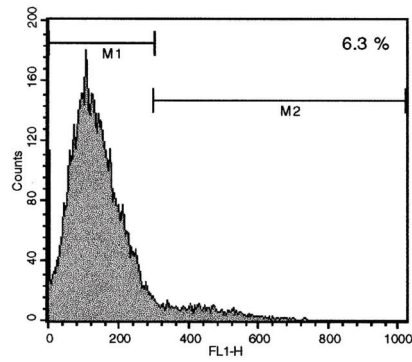


Abb.5.19. Nachweis der Phosphatidylserin-Exposition an der Aussenseite der Zellmembran nach Inkubation mit Mibefradil (Annexin-V-EGFP-Markierung, Fluoreszenzmikroskopie). Nach 2 h 20  $\mu$ M Mibefradil leicht gesteigerte Fluoreszenz gegenüber Kontrolle, nach 4 h 20  $\mu$ M Mibefradil deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität.

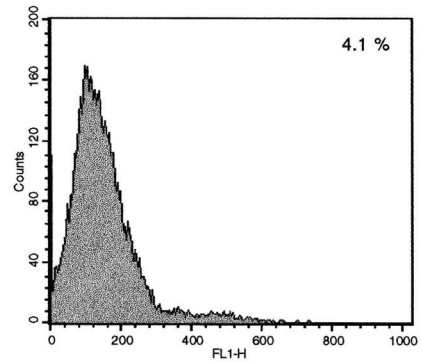
Die FACS-Analyse an HLE-B3 Zellen, dargestellt in Abb.5.20, bestätigt die in Abb.5.19 für hLEZ dargestellte Phosphatidylserin-Verlagerung auf die externe Zellmembranseite („Annexin-positiv“) durch Mibefradil-Inkubation. Mit zunehmender Mibefradil-Konzentration nimmt der Anteil fluoreszenzmarkierter Zellen kontinuierlich zu. Bei der Dosis 30  $\mu$ M Mibefradil sind über 50% der noch adhären Zellen Annexin-positiv. Der bei dieser Konzentration extra untersuchte Überstand umfasst alle vor Präparationsbeginn abgelösten, im Medium schwimmenden abgestorbenen Zellen und weist mit einem Anteil von 86% den höchsten Prozentsatz Annexin-positiver Zellen auf. Die Dosen 24 h 20 und 30  $\mu$ M entsprechen in ihrer Wirkung auf HLE-B3-Zellen in etwa der Wirkung von 24 h 10 und 20  $\mu$ M Mibefradil in den hLEZ, d.h. die HLE-B3 Zellen sind etwas weniger sensitiv gegenüber Mibefradil.



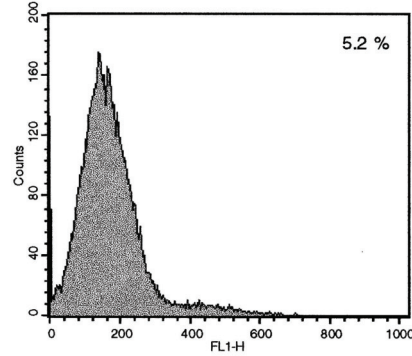
Kontrolle ohne Mibefradil



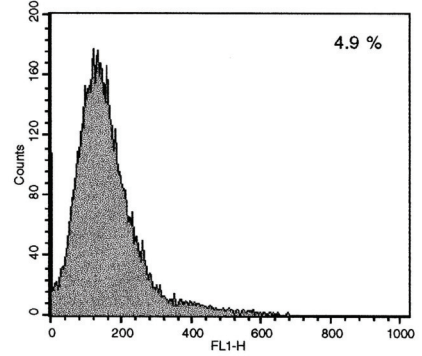
Mibefradil 5  $\mu$ M



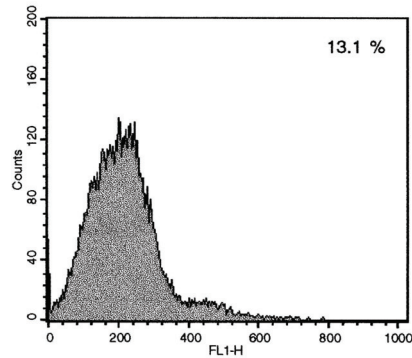
Mibefradil 10  $\mu$ M



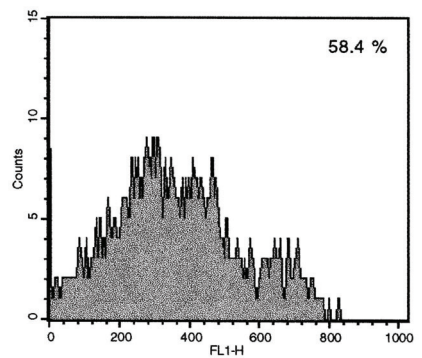
Mibefradil 15  $\mu$ M



Mibefradil 20  $\mu$ M



Mibefradil 30  $\mu$ M adh rente Zellen



Mibefradil 30  $\mu$ M Ueberstand

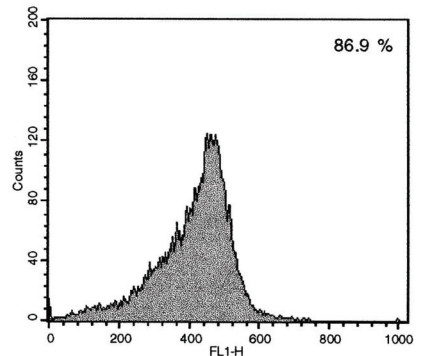


Abb.5.20. Apoptose in HLE-B3-Zellen nach 24 h Mibefradil-Inkubation (Annexin V-FITC; FACS-Analyse). Messung von adhärenten Zellen und abgelösten Zellen (Überstand). Schwache Phosphatidylserin-Exposition bei 24 h 20  $\mu$ M Mibefradil. Bei 24 h 30  $\mu$ M ist die Hälfte der adhärenten Zellpopulation Annexin-positiv, von den zu diesem Zeitpunkt abgelösten Zellen sind 87 % Annexin-positiv.

### 5.6.2 Intrazelluläre Verlagerung des proapoptotischen Proteins Bax

Für den Nachweis einer möglichen Mitochondrienbeteiligung an Mibefradil-induzierten Apoptoseprozessen (Abb.5.21) wurden sowohl die Mitochondrien (rot) als auch das Protein Bax (grün) fluoreszenzmarkiert. In der Kontrolle ist keine Kolokalisation sichtbar. Infolge der Mibefradil-Exposition (24 h 10  $\mu$ M Mibefradil) kommt es zu einer Verlagerung von Bax an die Mitochondrienmembran und in den Nukleus, sichtbar als Kolokalisation (gelb). Nach 24 h 20  $\mu$ M Mibefradil ist die Kolokalisation von Bax mit den Mitochondrien verstärkt (gelb) und die Mitochondrien sind nicht mehr um den Nukleus angeordnet, sondern im gesamten Zytoplasma der Zelle verteilt.

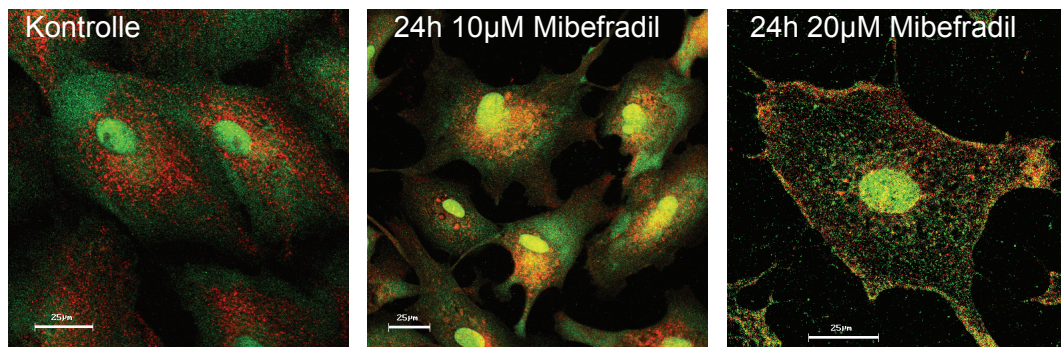


Abb.5.21. Apoptose: Einfluss von Mibefradil auf die Lokalisation des proapoptotischen Proteins Bax (grün) in hLEZ bei gleichzeitiger Mitochondrienmarkierung (rot), Fluoreszenzmikroskopie. Unter Mibefradil-Einfluss erfolgt eine Verlagerung der Mitochondrien und eine teilweise Kolokalisation (gelb) von Bax mit den Mitochondrien.

### 5.6.3 Caspase-3-Aktivität

Eine Aktivierung der Effektor-Caspase-3 markiert Apoptosestadien, die zeitlich der DNA-Fragmentierung (s. Kap. 5.6.4) vorausgehen. Die Untersuchung dieses Parameters diene dem Erfassen des zeitlichen Verlaufs der durch Mibefradil induzierten Apoptose in hLEZ.

Nach 4 h Inkubation mit 10  $\mu$ M Mibefradil - einem Zeitpunkt, für den bereits unter Kap. 5.2.2 eine Reduzierung der Zellkontaktfäche nachgewiesen wurde - lässt sich eine beginnende Caspase-3-Aktivität durch Fluoreszenz-markierte Antikörper nachweisen (Abb.5.22). Bei 24 h 10  $\mu$ M ist die Anzahl aktiver Caspase-3-Moleküle, die clusterartig aggregiert angeordnet sind, deutlich gesteigert. Zu diesem Zeitpunkt zeigen auch die Zellkerne starke Fluoreszenz als Folge einer Caspase-3-Translokation in den Zellkern.

In den bei 24 h 20  $\mu$ M noch adhären hLEZ erscheint die Caspase-3 aufgrund der intensiven homogenen Fluoreszenz in der gesamten Zelle aktiv.

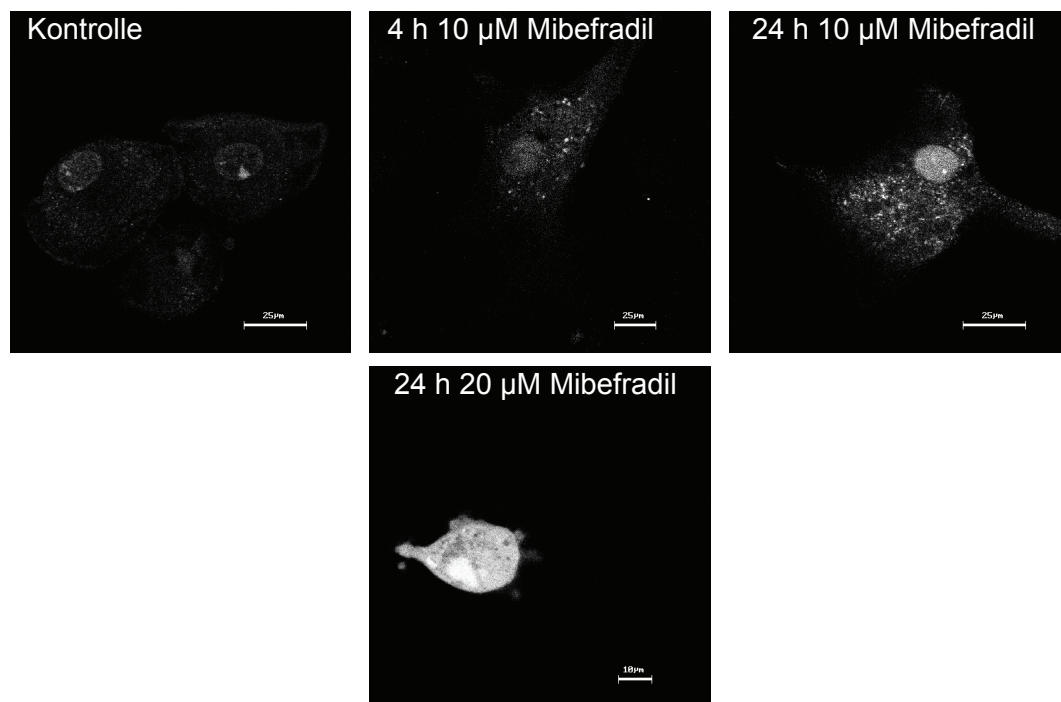


Abb.5.22. Caspase-3-Aktivität in hLEZ unter Mibefradil-Einfluß (Fluoreszenzmikroskopie). Bei 5 h 10  $\mu$ M Mibefradil geringe Caspase-3-Aktivierung, mäßige Aktivierung des Enzyms bei 24 h 10  $\mu$ M und starke Aktivierung bei 24 h 20  $\mu$ M Mibefradil.

#### 5.6.4 Effekt des T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf die DNA und das F-Aktinzytoskelett

Aus den im Kapitel 5.2 bis 5.5 beschriebenen Auswirkungen des T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf ausgewählte Zelleigenschaften von hLEZ ergibt sich die Frage, ob Mibefradil als externer Apoptose-Induktor wirkt. Die in Abschnitt 5.6.1 bis 5.6.3 dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin. Ebenso wären von einer Mibefradil-induzierten Modulation von Zytoskelettkomponenten Hinweise auf an der Zellantwort beteiligte intrazelluläre Signalwege zu erwarten. Mit einer Doppelfluoreszenzmarkierung wurde deshalb der Einfluss von Mibefradil auf die Organisation des F-Aktin-Zytoskeletts (Phalloidin-TRITC-Markierung; rot) und die DNA-Stabilität (Nachweis apoptotischer DNA-Fragmentierung durch den TUNEL-Test; grün) untersucht (Abb.5.23).

Unbehandelte hLEZ weisen ein ausgeprägtes, randständiges Aktinzytoskelett mit zum Teil langen, die Zelle durchziehenden Stressfasern auf. Die mittels DNase-Applikation absichtlich herbeigeführten DNA-Strangbrüche in Oligonucleotide (und hieraus resultierende kräftig fluoreszierende Zellkerne) dienen zum Vergleich bei der

Bewertung einer möglichen DNA-fragmentierenden Wirkung von Mibefradil. Das Zytoskelett wird durch DNase-Einwirkung nicht verändert. Bei 24 h 10  $\mu\text{M}$  Mibefradil-Inkubation treten vereinzelt DNA-Fragmentierungen auf, während das Aktin überwiegend seine ursprüngliche Organisationsform beibehält und lediglich den Zellformänderungen folgt. In der 24 h 20  $\mu\text{M}$ -Kombination bewirkt Mibefradil eine vollständige DNA-Oligomerisierung sowie einen fast vollständigen Abbau des Aktinzytoskeletts. Dieser Abbau des F-Aktins zeigt sich auch in Folge einer 48 h 10  $\mu\text{M}$  Mibefradil-Behandlung, während DNA-Strangbrüche mit dem TUNEL-Test nicht nachweisbar sind. Interessanterweise entspricht das Resultat der 72 h 10  $\mu\text{M}$  – Mibefradil-Dosis in etwa dem der 24 h 20  $\mu\text{M}$ -Kombination. Nur sind in ersterem desorganisierte Aktinreste noch nachweisbar.

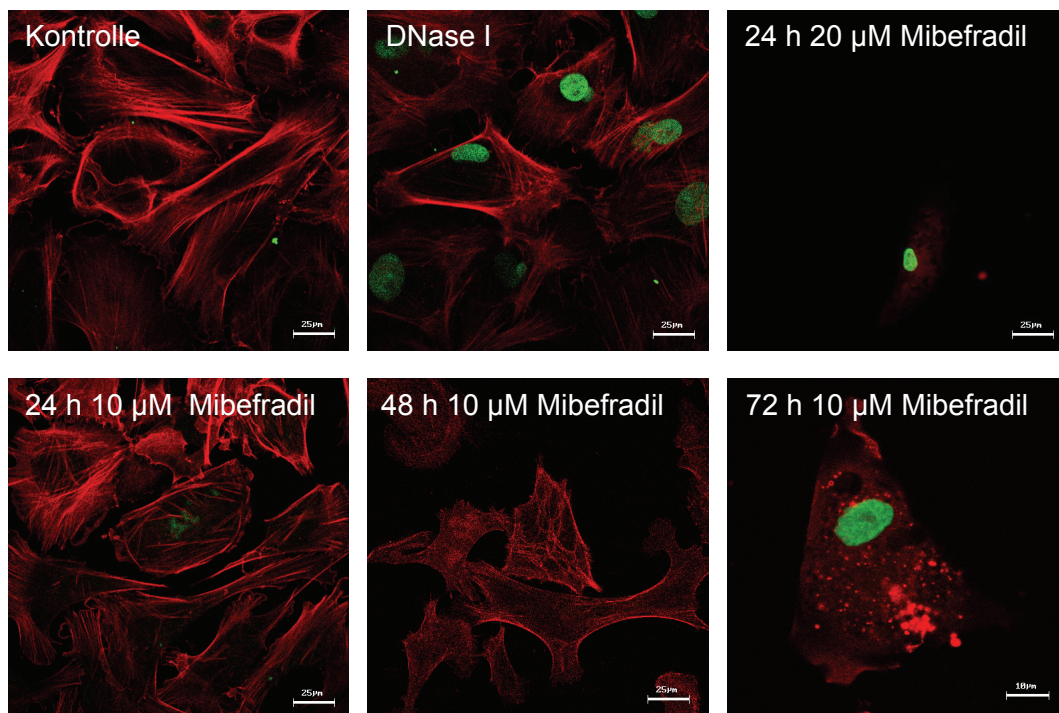


Abb.5.23. Mibefradil-induzierte Fragmentierung des F-Aktin-Zytoskeletts (rot) und DNA-Oligonukleotidabspaltung (TUNEL, grün). DNase-bedingte definierte DNA-Strangbrüche dienen als TUNEL-Positivkontrolle. Apoptose-Induktion durch Mibefradil nach 24 h 20  $\mu\text{M}$  und 72 h 10  $\mu\text{M}$ . F-Aktin-Fragmentierung nach 24 h 20  $\mu\text{M}$  Mibefradil sowie bei 10  $\mu\text{M}$  beginnend ab 48 h.

#### 5.6.5 Effekt des alternativen T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Ethosuximid auf die DNA und das F-Aktinzytoskelett

Ausgehend von der eingangs erwähnten Hypothese, durch den Einsatz des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockers Mibefradil die Adhäsion von postoperativ zentripetal



proliferierenden und migrierenden Linsenepithelzellen durch Eingreifen in Kalzium-abhängige Adhäsionsmechanismen zu inhibieren, soll die Verwendung eines alternativen spezifischen T-Kanal Blockers Aufschluß darüber geben, ob die in Abschnitt 5.6.1 festgestellte Apoptose-induzierende Wirkung von Mibefradil allen T-Kanal-Antagonisten eigen ist.

In den mit 24 h 1 mM bzw. 10 mM Ethosuximid inkubierten hLEZ konnten keine Unterschiede zum Erscheinungsbild eines intakten Aktin-Zytoskeletts in den Kontrollen gefunden werden (Abb.5.24). Ein DNA-Abbau findet nur in der DNase-Kontrolle statt. Eine Apoptose-Induktion durch den T-Typ Kalziumkanal-Blocker Ethosuximid ist nicht nachweisbar.

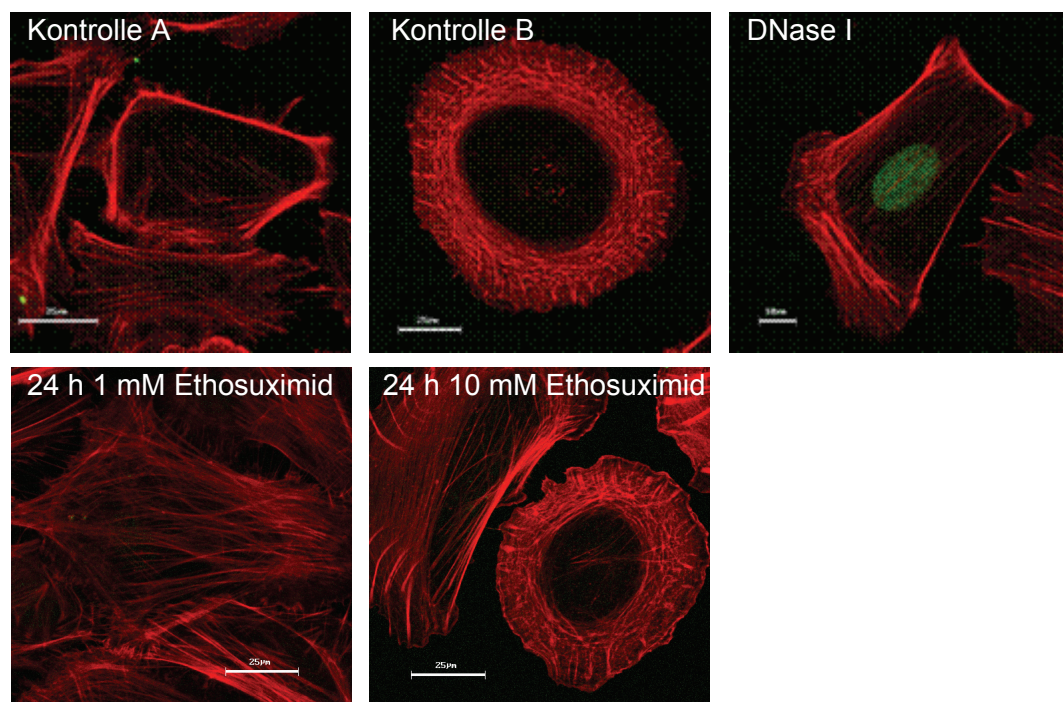


Abb.5.24. Einfluss von Ethosuximid auf F-Aktin (rot) und DNA (grün) in hLEZ (Fluoreszenzmikroskopie, alle Einzelbilder bei gleicher Vergrößerung aufgenommen, Bar 25 µm).

#### 5.6.6 Effekt des L-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Nifedipin auf die DNA und das F-Aktinzytoskelett

Analog zu den Resultaten in Kap. 5.6.2 lassen sich auch für Nifedipin keine Veränderungen des F-Aktin-Zytoskeletts oder DNA-Strangbrüche für den angegebenen Dosisbereich feststellen (Abb.5.25). Es sind keine Unterschiede hinsichtlich des Zellwachstums zwischen den Nifedipin-behandelten Zellkulturen im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

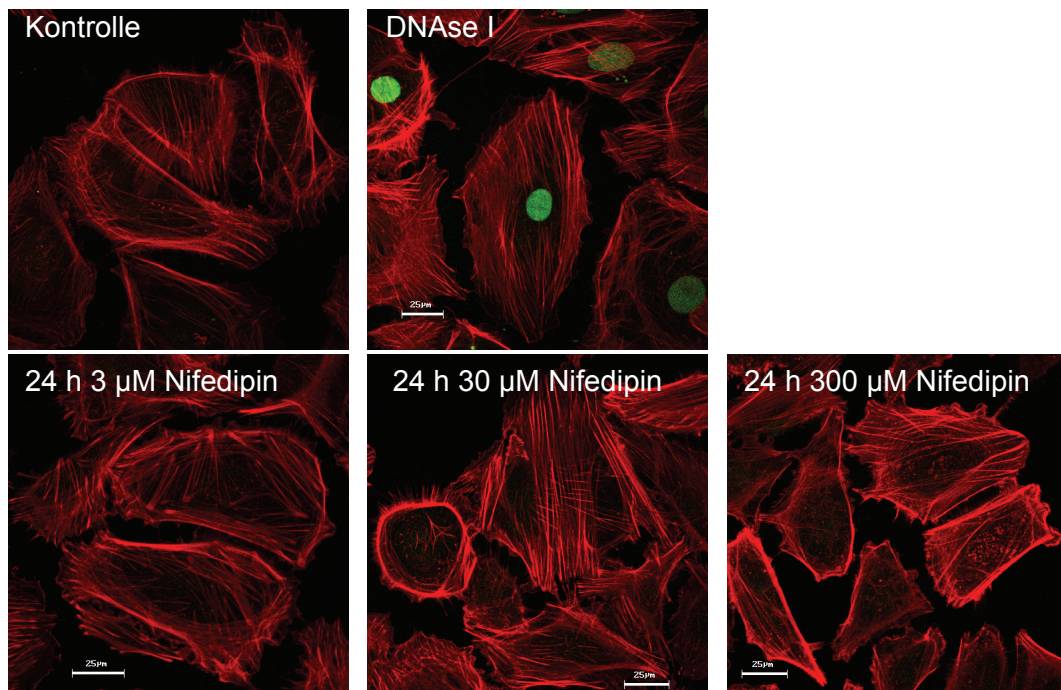


Abb.5.25. Einfluss von Nifedipin auf F-Aktin (rot) und DNA (grün) in hLEZ (Fluoreszenz-mikroskopie, alle Einzelbilder bei gleicher Vergrößerung aufgenommen, Bar 25 µm).

#### 5.6.7 Proliferation und Apoptose von HLE-B3 Zellen unter Mibefradil

Flowzytometrische Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose an der Zelllinie HLE-B3 bestätigten die apoptotische Wirkung von Mibefradil, wie sie für hLEZ nachgewiesen werden konnte. So nimmt der Anteil der Zellpopulation im sub-G1-Peak des DNA-Histogramms zu, was als Indiz für fragmentierte DNA zu werten ist (s. Abb.5.26). Die Proliferation der HLE-B3-Zellen ist damit einhergehend durch Mibefradil reduziert.

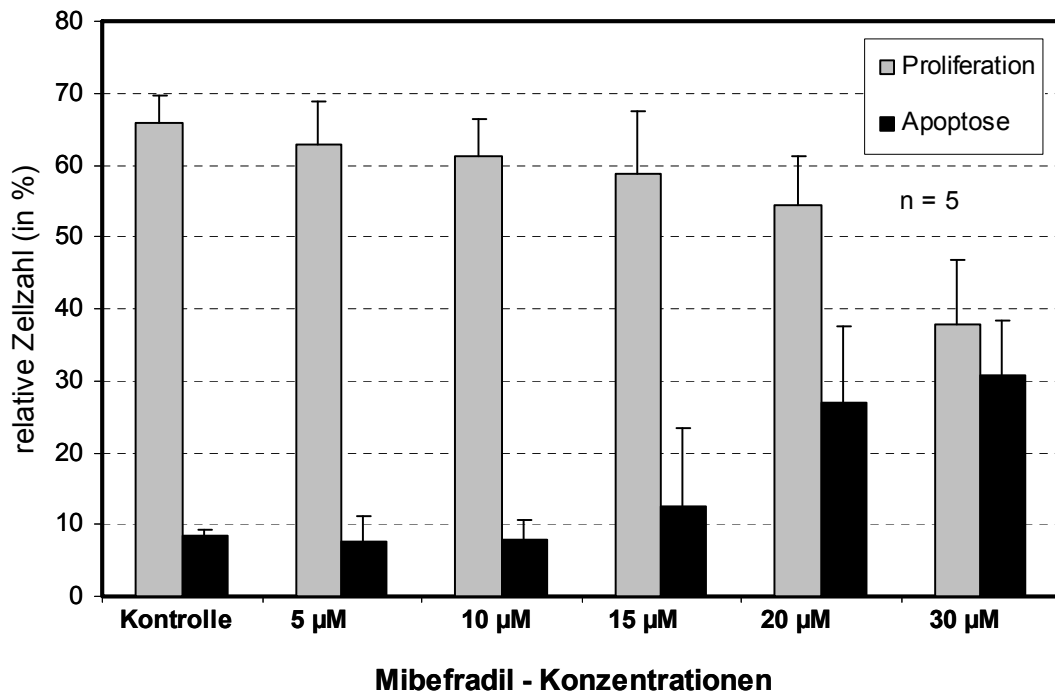


Abb.5.26. Proliferation (prozentualer Anteil von Zellen in S+G<sub>2</sub>) und Apoptose (prozentualer Anteil von Zellen in sub-G<sub>1</sub>) von HLE-B3-Zellen nach 24 h Mibefradil-Inkubation (FACS-Analyse, ModFIT).

## 5.7 Wirkung von Mibefradil auf Ionenströme in hLEZ

Der Austausch der Badlösung durch physiologische Standardlösung mit Mibefradil (10 µM) reduziert die prominente, im Abschnitt zur elektrophysiologischen Charakterisierung ausgewählter Stromkomponenten als verzögerten Auswärtsgleichrichter-K<sup>+</sup>-Strom identifizierte Stromkomponente von hLEZ innerhalb von 3 min stark (Abb.5.27A-C). Die gleiche Konzentration führt zu einer vollständigen Inhibition des einwärtsgerichteten, als spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Stromes durch T-Kanäle charakterisierten Stroms (Abb.5.27A, B). Der Differenzstrom (C) zeigt die durch 10 µM Mibefradil inhibierten Gesamtstromanteile als Nettoströme.

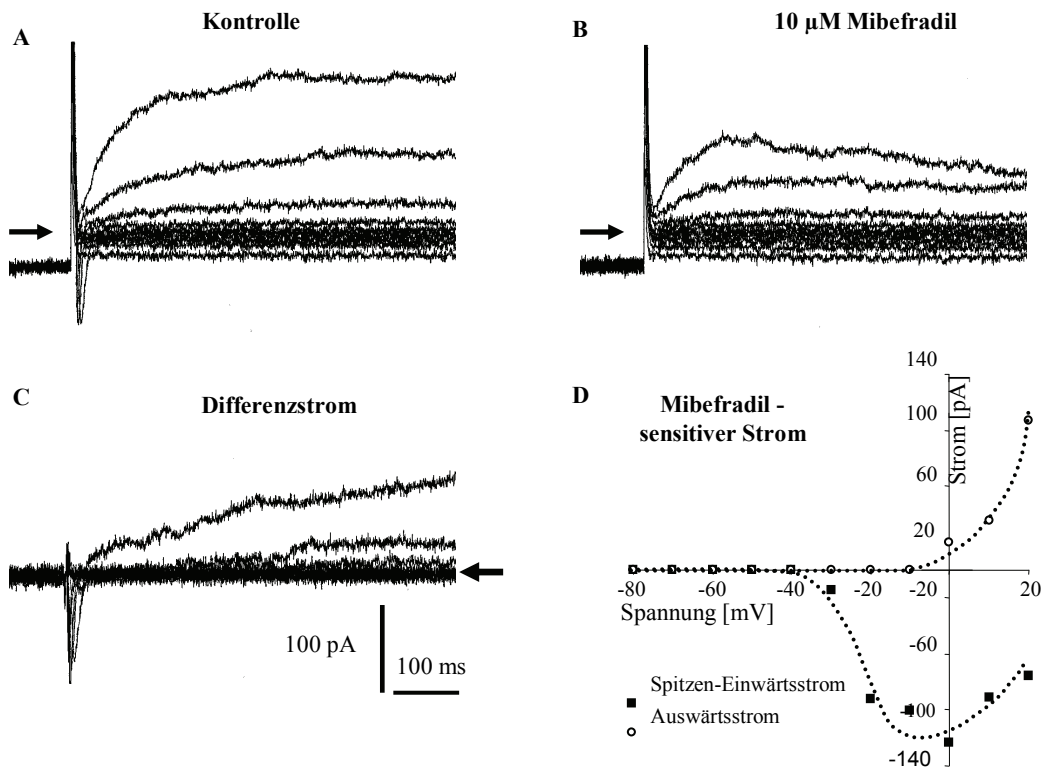


Abb.5.27. Beispiel der Whole-cell-Stromableitung einer Linsenepithelzelle (K<sup>+</sup>-Pipettenlösung, n = 3). (A) Kontrolle, (B) Effekt von 10  $\mu$ M Mibefradil, (C) Differenzstrom, (D) Strom-Spannungsrelation Mibefradil-sensitiver Ströme. (Messung in PSS mit 2,5 mM Ca<sup>2+</sup>, Haltepotential -90 mV, schrittweise Anhebung für 500 ms zu den Testpotentialen. Pfeile zeigen die Nullstromlinie an.

Sporadisch detektierbare L-Kanal-typische Ca<sup>2+</sup>-Ströme wurden durch 1  $\mu$ M Mibefradil um ca. 60% reduziert (Abb.5.28 B).

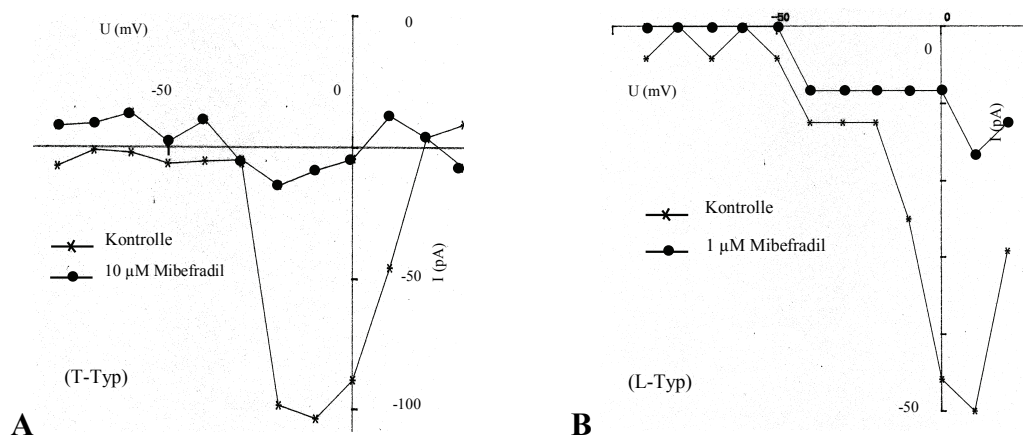


Abb.5.28. Beispiel für die Inhibition spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Ströme in hLEZ durch Mibefradil (Patch clamp, n = 4). Vollständige Inhibition des T-Typ Kalzium Einwärtsstromes durch 10  $\mu$ M Mibefradil (A). Teilweise Reduzierung des L-Typ-Kalzium-Einwärtsstromes durch 1  $\mu$ M Mibefradil (B).



Die Mibefradil-Konzentration 3  $\mu\text{M}$  ergab eine starke Reduzierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (ca. 80%), wobei die halbmaximale Inhibition des Spitzeneinwärtsstroms für hLEZ bei ca. 1  $\mu\text{M}$  zu erwarten wäre (Abb.5.29A-D). Die Verwendung von 0,3  $\mu\text{M}$  Mibefradil erbrachte keine sichtbare Kalzium-Stromreduzierung.

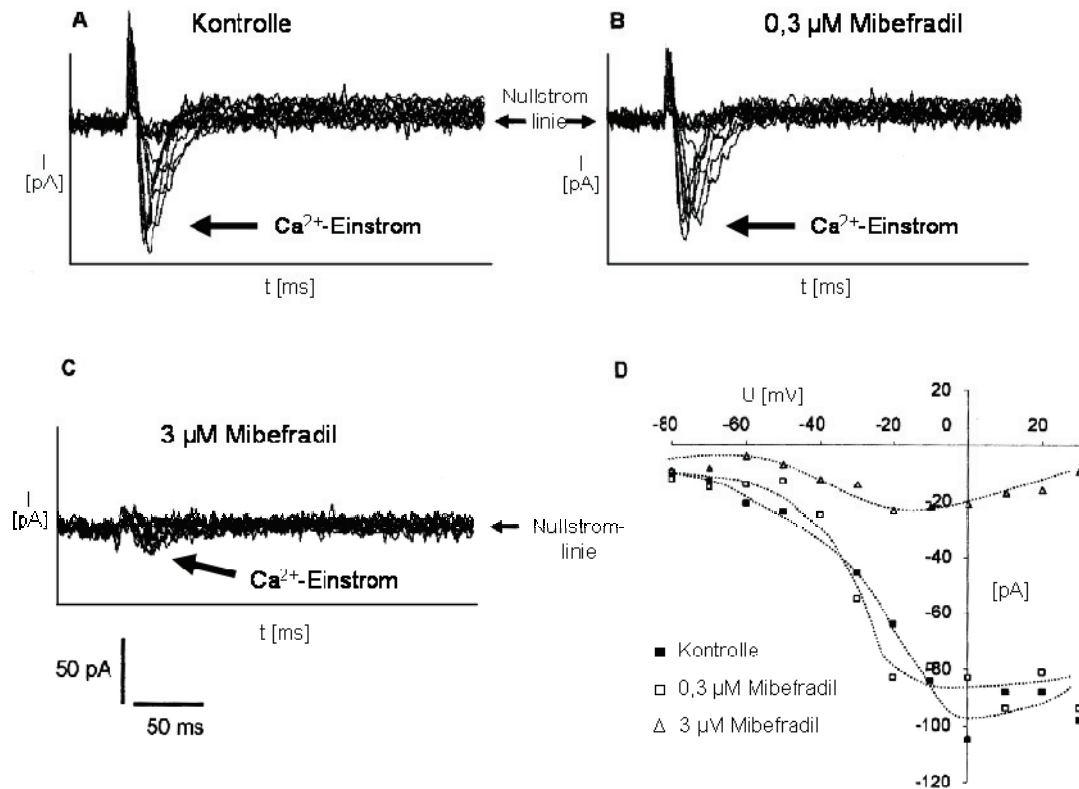


Abb.5.29. Beispiele von Netto-whole-cell Strömen ( $\text{Cs}^+$ -Pipettenlösung,  $n = 3$ ) einer hLEZ (A) und Effekt von 0,3  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  Mibefradil (B, C). Darstellung des Spitzeneinwärtsstroms aus A-C (D). (Messung in physiologischer Badlösung mit 2,5 mM Kalzium bei Haltepotential -90 mV; Testpotentialpulse für 500 ms von -80 bis +30 mV ansteigend).

## 6 Diskussion

### 6.1 Phänotyp-Charakterisierung anteriorer Linsenepithelzellen und deren Eignung als Nachstarmodell

Bei allen zellbiologischen Untersuchungen von Vorgängen, die nach der Katarakt-OP zur Nachstarausbildung führen, ist ein geeignetes Zellmodell notwendig. Für das Verfolgen zellulärer und molekularer Mechanismen bei der PCO-Formierung reichen Ansätze von einfachen Zellkulturtechniken bis zu in vivo-Modellen (s. Übersichten in Saxby et al. 1998, Wormstone et al. 2001). Da in den seltensten Fällen die eigentlichen Nachstar-Urheber beim Menschen, die äquatorialen Linsenepithelzellen, zur Verfügung stehen, muss als Kompromiss auf das bei dem Eingriff ohnehin entnommene anteriore Kapselsackfragment zurückgegriffen werden. Dieses Vorgehen stellt trotz unterschiedlichem Regenerationsverhalten und Genexpressionsmuster von nativem anteriorem und äquatorialem Linsenepithel (Hodgkinson et al. 2007, Tamiya & Delamere 2005, Maidment et al. 2004, Auffarth & Völcker 2001) immer noch die größtmögliche Annäherung an die Verhältnisse nach der Kataraktchirurgie dar, will man mit primären humanen Linsenepithelzellen arbeiten. Diese Zellen gewinnen insofern noch zusätzlich an Wert, da sie wie die im Auge verbleibenden äquatorialen Linsenepithelzellen ebenfalls durch den chirurgischen Eingriff und die Entnahme einen traumatischen Wundreiz (Störung von Zell-Zell-Kontakten) erfahren. Der Verlust der Integrität des Linsenepithels induziert Wundheilungsreaktionen mit charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie (Elongation, Myofibroblast-Phänotyp) und Genexpression (Expression von  $\alpha$ -SMA, Kollagen Typ I) als Kennzeichen einer Epithelial-Mesenchymalen Transformation (Caporossi et al. 1998, Hara et al. 1992, Joo et al. 1999, Nagamoto et al. 2000, Schmitt-Gräff et al. 1990, Weaver et al. 2007, Wunderlich et al. 2000). Es ist experimentell belegt, dass Linsenepithelzellen, die auf Plastiksubstraten oder in Kollagengelen kultiviert werden, ebenfalls zu myofibroblastenähnlichen Zellen transformieren (Greenburg & Hay 1986, Kurosaka et al. 1995, Schmitt-Gräff et al. 1990, Veroman et Viikmaa 1989). Die Annahme mesenchymaler Eigenschaften wurde an den in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Linsenepithelzellen der anterioren Linsenkapsel im Zellkulturexperiment nachgewiesen (zunehmender Zelldurchmesser, Übergang der polygonalen Zellform zu langgestreckt-flächiger Zellform, Verlust von Zellverbindungen, Expression von  $\alpha$ -SMA, Kollagen Typ I und Fibronectin, s. Kap.5.1). Allerdings sind Zellkulturen stark vereinfachte Systeme, die den Linsenepithelzellen nicht die natürliche Kammerwasser-Umgebung ersetzen können. Deshalb werden insbesondere pharmakologische

Untersuchungen üblicherweise zunächst an Zellkulturmodellen durchgeführt, dann auf Tierversuche übertragen und im nächsten Schritt für Klinische Studien zugelassen werden. Erst nach erfolgreicher Passage dieser drei vorgeschriebenen Stufen ist dann eine human-therapeutische Anwendung möglich. Für die vorliegende Arbeit wurde das auf dem vorderen zentralen Kapselsackexplantat befindliche Linsenepithel als Zellkulturmodell gewählt. Für ausgewählte quantitative Experimente, vor allem flowzytometrische Untersuchungen, wurde die humane Linsenepithelzelllinie HLE-B3 verwendet. Diese Zelllinie wurde aus infantilen Linsenepithelzellen gewonnen, die durch Infektion mit dem Adenovirus Ad12-SV40 Virushybrid immortalisiert wurden. Für die Untersuchung struktureller Parameter kam sie aufgrund eines schwach formierten Zytoskeletts nicht zum Einsatz (s. Kap. 5.1.3 Vergleich des Aktin-Zytoskeletts in hLEZ und HLE-B3 Zellen).

Die durch den chirurgischen Eingriff und die dadurch postoperativ veränderten Verhältnisse im vorderen Augenabschnitt (u.a. zeitlich begrenzter direkter Zugang zum Linsenepithel, Störung der Blut-Kammerwasser-Schranke, veränderte Kammerwasserzusammensetzung, Zytokinproduktion) führen zur Metaplasie der Linsenepithelzellen. Sowohl anteriore als auch äquatoriale LEZ durchlaufen eine Epithelial-mesenchymalen Transformation (Apple & Rabb 1998, Apple et al. 1992, Kappelhof & Vrensen 1992), aber nur die äquatorialen Zellen beginnen in vivo auf die posteriore Kapsel zu migrieren (Bertelmann & Kojetinsky 2001). Deshalb erfolgte vor Beginn der eigentlichen zentralen Experimente eine phänotypische Charakterisierung der kultivierten Primärzellen. Die untersuchten Linsenepithelzellen besitzen sowohl epithelzelltypische als auch mesenchymale Eigenschaften (s. Tab.6.1). Als epitheliale Merkmale einordnen lassen sich das überwiegend im Monolayer erfolgende Wachstum und die Sekretion der Basalmembran-typischen extrazellulären Matrixproteine Kollagen IV und Laminin. Auch die noch kuboide Zellform explantatnah ausgewachsener Zellen mit Ausbildung von Tight Junctions und teilweise membranständigem Aktinzytoskelett sind als epithelial einzuordnen, denn nur Zellen mit eindeutig definierten Zell-Zell-Kontakten wie z.B. Epithelzellen, assemblieren ein subkortikales Aktin-Zytoskelett (Wang et al. 1999). Als mesenchymale Eigenschaften traten die Expression von filamentösem  $\alpha$ -Smooth muscle actin und die Ausbildung kräftiger Aktin-Stressfilamente auf. Aktin-Stressfasern, welche an Fokalkontakten konvergieren und die entwickelte Zugspannung dort auf das Substrat übertragen, sind typisch für individuell ohne Formierung starker Zell-Zell-Adhäsionen wachsende Zellen wie Fibroblasten und (Burridge & Chrzanowska-Wodnicka 1996). Auch die Synthese des Matrixproteins Kollagen I (Kap.5.1.2) weist auf die Phänotypverschiebung hin (vgl. Shigemitsu et al. (1999) in Kap.2.1 Tab.2.1). Der Verlust des epithelialen Phänotyps

zeigte sich auch in der Delokalisation des Tight Junction-assoziierten Protein Zonula Occludens-1 (ZO-1) nach Subkultur (s. Abb.5.7). Die nukleäre Lokalisation von ZO-1 entspricht experimentellen Befunden von Gottardi et al. (1996), die in verschiedenen Zelllinien neben der Formierung am Rand von Zell-Zell-Kontakten auch eine Akkumulation im Zellkern beobachteten. Diese ZO-1-Rückverlagerung erwies sich in Untersuchungen dieser Autoren als sensitiv gegenüber dem Status des Zell-Zell-Kontakts und konnte in experimentell erzeugten Wundbereichen kultivierter Epithelzellen stimuliert werden. Diese Befunde unterstreichen in Übereinstimmung mit Lee et al. (2007), Weaver et al. (2007) und de Longh et al. (2005) eine Zwischenstellung des transdifferenzierten Zelltyps zwischen Epithel und Mesenchym. Die Ergebnisse der Charakterisierung zeigen eindeutig, dass die hLEZ in den vorliegenden Versuchen dem durch Marcantonio & Vrensen (1999) charakterisierten in vivo-Phänotyp von LEZ entsprechen, die durch die Kapsulorhexis während der Kataraktchirurgie aktiviert werden, eine epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung durchlaufen und für die Entstehung des Nachstars verantwortlich sind (Meacock et al. 2000).

Um einerseits individuell bedingte Unterschiede zwischen den Explantatkulturen auszugleichen und andererseits höhere Zellzahlen für die Versuchsansätze zur Verfügung zu haben, wurden die Zellen nach enzymatischer Dissoziation vom Kapselsack und des Kulturschalenbodens gepoolt und aliquotiert. Dieses Vorgehen ist für die Interpretation der erzielten Versuchsergebnisse insofern von Bedeutung, als eine eindeutig ablesbare Reaktion der Zellmehrheit für gleiche Zellreaktionen auf Einzelzellebene spricht trotz unterschiedlicher individueller Herkunft und Historie (z.B. Patientenalter, Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme). Viele okuläre oder systemische Faktoren können Nachstarhäufigkeit und Ausprägungsgrad beeinflussen (Krishna et al. 1998, Dana et al. 1997, Ionides et al. 1994, Kühle et al. 1997, Auffarth et al. 1997). Bedeutendster systemischer Einflussfaktor auf die PCO-Entwicklung ist das Patientenalter (Apple et al. 1992). Nahezu 100% aller pädiatrischen Patienten mit intakt belassener Hinterkapsel entwickeln innerhalb von 2 Jahren postoperativ einen Nachstar, da bei jungen Patienten ein höheres Wachstumspotential der Linsenepithelzellen vorliegt (Sharma et al. 1999). Um die meist älteren Patienten entstammenden und nur begrenzt proliferationsfreudigen Zellen dennoch in ausreichendem Maße kultivieren zu können, wurde im Zellkulturmodell mit Serumhaltigem Medium gearbeitet.

Weil Epithelzellen charakteristischerweise im adhärennten Zellverband auf einer Basalmembran wachsen, deren Matrixzusammensetzung sie selber definieren, wurden

die intraoperativ gewonnenen hLEZ zur Förderung des Adhärerens und des Zellwachstums auf Kollagen Typ I-beschichteten Zellkulturplatten bzw. Deckgläsern kultiviert. Zudem wurde Kollagen I als Kapselwand-Bestandteil in humanen Katarakt-Linsenkapseln nachgewiesen (Azuma et al. 1998, Shigemitsu et al. 1999).

Tab.6.1. Zusammenfassung der untersuchten phänotypischen Zelleigenschaften der primären humanen Linsenepithelzellen und daraus abgeleitete Zuordnung zum Zelltypus.

Zelleigenschaften bzw. Strukturmerkmale	Zelltypus-Zuordnung der Eigenschaften ausgewachsener hLEZ anhand der Merkmalsausprägung	
	Epithel	Mesenchym
Zellform und -größe	klein, rundlich	groß, flächig
Sekretion extrazellulärer Matrixproteine	Kollagen IV, Laminin	Kollagen I
Aktin-Zytoskelett	kortikal	Stressfasern
$\alpha$ -smooth-muscle actin	nicht vorhanden	vorhanden
tight junctions (ZO-1)	z.T. noch Zellmembran-assoziiert vorhanden	zytoplasmatisch oder nukleär
Integrine	nicht nachgewiesen	$\beta 1$

Um der Frage nachzugehen, ob die im Ergebnisteil dargestellten zellulären Effekte des T-Kanalblockers Mibefradil auf ein Angreifen an spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom T-Typ zurückführbar sind, wurden die hLEZ mittels Patch-Clamp-Technik auf das Vorhandensein von T-Kanälen geprüft. Überraschenderweise wies ein beträchtlicher Teil der elektrophysiologisch untersuchten hLEZ-Population T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-typische Ströme auf (Kap. 5.1.7 Elektrophysiologische Bestimmung ausgewählter spannungsabhängiger Stromkomponenten von whole cell-Strömen in hLEZ), womit nach eigenem Kenntnisstand der Erstnachweis dieser für elektrisch erregbare Zellen charakteristischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme für humane Linsenepithelzellen erbracht wurde.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme vom L-Typ waren dagegen nur in Einzelfällen messbar. Die Expression von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in kultivierten primären humanen Linsenepithelzellen wiesen bereits Shepard & Rae (1998) nach, indem sie mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus mRNA zu dieser komplementäre DNA (cDNA) erstellten und die darin enthaltene komplette cDNA-Sequenz für diesen Ionenkanaltyp identifizierten. Zwischen Expression von T- und L-Typ Kalziumkanälen in Zellen und deren Proliferation wird bereits seit längerem ein Zusammenhang vermutet, denn Studien haben eine zellzyklusabhängige Expression sowohl von T- als auch L-Kanälen ergeben (Kuga et al. 1996), wobei der Einfluss von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen auf die Proliferation wesentlich größer zu sein scheint und auch die Tumorphiliferation zu regulieren vermag (Panner & Wurster 2006).

## **6.2 Einfluss des T-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Mibefradil auf Zellfunktionen primärer humaner Linsenepithelzellen**

### Proliferation

Da der Kalzium-Einstrom in die Zelle u.a. durch spannungsabhängige Kalziumkanäle erfolgen kann, und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dadurch verändert werden kann, sind aufgrund der Abhängigkeit des Zellzyklusprogresses von einem zeitlich korrekten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von einer pharmakologischen Blockade dieser Kanäle Auswirkungen auf die Zellproliferation zu erwarten.

Kalzium stellt einen Regulator verschiedener Kontrollpunkte im Zellzyklus von Säugetierzellen dar, einschließlich der frühen  $G_1$ -Phase und des  $G_1$ -S Übergangs (Kahl & Means 2003). In verschiedenen Zelltypen wird die DNA-Synthese vollständig inhibiert, wenn extrazelluläres Kalzium durch EGTA cheliert oder der Influx von extrazellulärem Kalzium durch Kobalt blockiert wurde (Tomono et al. 1996). In ähnlicher Weise resultierte der Entzug extrazellulären Kalziums während der ersten 8 Stunden nach Wachstumsfaktor-Stimulierung in einer DNA-Synthese-Inhibition in humanen Fibroblasten (Takuwa et al. 1992). Darüber hinaus führte die Entleerung intrazellulärer Kalzium-Speicher durch Pharmaka wie dem Inhibitor der Sarco-/Endoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase (SERCA) Thapsigargin zu einer signifikanten Ausserkraftsetzung bzw. Verzögerung des Zellzyklus-Fortschreitens zur S-Phase (Short et al. 1993, Simon & Moran 2001). Da  $10^{-5}$   $\mu\text{M}$  Mibefradil, wie im Ergebnisteil dargestellt, mindestens den Kalzium-Influx über spannungsabhängige T-Typ Kalzium-Kanäle inhibiert (Kap. 5.7) und es dabei offensichtlich nicht zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherleerung kommt (Meißner 2007), wären allein damit bereits die wesentlichen Voraussetzungen für einen  $G_1$ -Arrest, z.B. durch unterdrückte Cyclin-Expression gegeben.

### Adhäsionskomponenten

An adhärenenten Primärzellen bewirkt Mibefradil eine rasch einsetzende Reduzierung der Zellkontaktfläche (s. Abb.5.11), die im weiteren Zeitverlauf zur Aufrundung der Zellen und schliesslich bis zur Zellablösung führt. Diese lichtmikroskopisch beobachtbaren zeit- und dosisabhängigen Morphologieänderungen lassen auf eine frühzeitige Beeinflussung von Adhäsionsrezeptoren schliessen. Die in HLE-B3 nach 24h nachgewiesene Reduzierung reduzierte Integrinexpression (s. Kap.5.2.4) und die Mibefradil-bedingte Clusterung (Beck et al. 2001) der auch in primären hLEZ

exprimierten Integrin-Untereinheiten  $\alpha_3$  und  $\beta_1$  (Nebe et al. 2004) belegen dies. Bei der Interpretation zu berücksichtigen ist, dass die Reduktion der Integrinexpression aufgrund der höheren Empfindlichkeitsschwelle der Zelllinie (s. Kap.5.6.1) erst bei Mibefradilkonzentrationen ab 20  $\mu\text{M}$  signifikant ausfällt. Extrazelluläre Matrix (EZM)-Rezeptoren (z.B. Integrine), EZM-modifizierende Proteine (z.B. Matrixmetalloproteinasen) und extrazelluläre bzw. zelluläre Spannung vermitteln regulatorische Wechselbeziehungen zwischen Zelle und Matrix (Daley et al. 2008). Entsprechend sind begleitende Veränderungen der Extrazellulären Matrix und ihrer Bestandteile zu erwarten. Differenzierte Veränderungen in der Sekretion extrazellulärer Matrixproteine sind in hLEZ nach 24 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Mibefradil nachweisbar (s. Kap.5.5). Kollagen I und II werden in etwa gleich stark sezerniert, jedoch eher zentripetal verteilt, während die Sekretion von Kollagen IV, Fibronektin und Laminin perinukleär leicht gesteigert erscheint. Zu berücksichtigen ist dabei, dass die Zusammenziehung der Zellen optisch eine Verdichtung der Fluoreszenz verursacht, welche die Clusterung verstärkt und zu einer scheinbaren Helligkeitssteigerung führt.

Die HLE-B3-Zellen reagieren auf Mibefradil mit einem Proliferationsstop, Adhäsionsreduktion bis hin zum vollständigen Kontaktverlust zum Substrat und bei höheren Konzentrationen mit Apoptoseinduktion (s. Abb.5.26 sowie Abb.5.20). Da sie jedoch im Vergleich zu Myofibroblasten und hLEZ nicht über entsprechende kontraktile Eigenschaften verfügen (sehr schwach formiertes Aktinzytoskelett), erfolgt die Ablösung ohne durchflusszytometrisch messbare morphologische Veränderungen (s. Abb.5.17).

Ein vitro-Versuch an humanen Cornea-Explantaten (s. Abb.5.14) bestätigte die Annahme, dass geschlossene Zellverbände (Hornhautendothel) weniger leicht durch Mibefradil angreifbar sind als Einzelzellen (subkonfluente Linsenepithelzellen, vgl. Abb.5.10). Erkennbar war dies durch ein zeitlich verzögertes Einsetzen der Zellablösung bzw. die Notwendigkeit gesteigerter Mibefradil-Konzentrationen für das Hervorrufen eines vergleichbaren Schadensbildes. Dieser Einzelversuch liefert mit seinem erkennbaren Ergebnistrend nur ein Indiz für die Beurteilung der Auswirkung von Mibefradil auf okuläre Gewebe, weist jedoch auf die Bedeutung von Tierversuchen auf dem Weg zur humanen Therapieanwendung hin.

Eine in vivo-Testung von Mibefradil im Kaninchenmodell ergab keine elektronenmikroskopisch erfassbaren morphologischen Veränderungen des Corneaendothels (s. Abb.5.16). Kaninchenaugen sind in der ophthalmologischen Forschung als Modell etabliert, denn sie kommen den Größenverhältnissen des menschlichen Auges sehr nahe. Das Versuchsergebnis lässt sich mit dem relativ rasch erfolgenden Kammerwasseraustausch (2-3 ml/Tag; Michelson 2000) erklären. Die

Menge des Kammerwassers beträgt im humanen Auge etwa 0,25 ml und die Kammerwasserproduktion ca. 2 µl/min, so dass sich der gesamte Vorderkammerinhalt in etwa 10 Stunden vollständig erneuert (Müller & Pietruschka 1976). Die Einwirkzeit des Pharmakons in der injizierten Konzentration betrug somit weit weniger als 24h und das Hornhautendothel wurde erst nach einer Erholungsphase von 40 Tagen begutachtet. Das bedeutet, dass in die Vorderkammer gelangendes Mibefradil innerhalb eines halben Tages stark verdünnt und eliminiert wird, so dass Dauerschädigungen angrenzender Gewebe bei einer Mibefradil-Anwendung im abgedichteten Kapselsack vermeidbar sind.

### **6.3 Einfluss von Kalziumkanal-Antagonisten auf Zytoskelett und Apoptose primärer humaner Linsenepithelzellen**

#### T-Typ Kalzium-Antagonist Ethosuximid

Ethosuximid (ETX) wurde als alternativer T- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker ausgewählt, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Blockade von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen maßgeblich für die adhäsionshemmende Wirkung von Mibefradil verantwortlich ist.

Ethosuximid wird aufgrund seiner krampflösenden Wirkung zur Behandlung von Epilepsien, insbesondere von generalisierten Absencen angewendet. Therapeutisch relevante Plasmakonzentrationen bewegen sich im Bereich zwischen 0,25 und 0,75 mM (Broicher et al. 2007, Browne et al. 1975, Lacinová et al. 2000b). In Einzelfällen sind bis zu 150 mg/l (1000 µmol/l) notwendig und werden toleriert, insofern sie durch langsame Titration erreicht werden (Sherwin et al. 1973).

Ethosuximid reduziert in therapeutisch relevanten Konzentrationen T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in Thalamus-Neuronen (Coulter et al. 1989). Gomora et al. (2001) konnten nachweisen, dass Ethosuximid humane klonierte T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aller drei Strukturtypen in transfizierten HEK-293 Zellen blockiert. Gomora et al. (2001) ermittelten für diese Substanz eine  $\text{IC}_{(50)} = 0,6 \text{ mM}$  für den Block von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen.

Anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse (s. Kap. 5.6.5) kann die Aussage getroffen werden, dass Ethosuximid die Organisation des F-Aktinzytoskeletts nicht verändert, nicht zur DNA-Fragmentation führt und auch keine Zellformveränderungen oder Zelldetachment auslöst. Da Ethosuximid weder lichtmikroskopisch erfassbare Morphologie-modifizierende Eigenschaften noch Apoptose-induzierende Wirkung besitzt, muss die T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockade als alleinige Ursache Mibefradil-bedingter



zellulärer Effekte ausscheiden. D.h. die Zugehörigkeit zur Substanzklasse der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalantagonisten allein bedingt keine Adhäsionsinhibition und Apoptose in den hier untersuchten Zellen. Es muss demnach davon ausgegangen werden, dass innerhalb der Gruppe „T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalantagonist“ die Ursache für unterschiedliche zelluläre Effekte in der individuellen Struktur der jeweiligen Vertreter zu suchen ist. Mibefradil als Tetralinderivat (Nicht-Dihydropyridin) muss also Eigenschaften jenseits der T-Kanalblockade besitzen, die es von denjenigen von Ethosuximid unterscheiden. Da selbst chemisch eng verwandten Dihydropyridin-Derivaten aus der Gruppe der L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalantagonisten unterschiedliche zelluläre Effekte nachgewiesen wurden (Yoshida et al. 2003), scheint gleiches auch für T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalantagonisten zu gelten. Erschwerend kommt hinzu, dass gegenwärtig keine zuverlässigen selektiven T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalantagonisten verfügbar sind. Ein experimenteller Vergleich durch Broicher et al. (2007) von ETX mit Mibefradil hinsichtlich T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom-abhängiger Effekte in vivo und in vitro im Rattenmodell ergab für Mibefradil weitaus komplexere Zellauswirkungen als für ETX. Demnach war der Gesamteffekt von ETX durch eine alleinige Reduktion des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms reproduzierbar, wobei jedoch das notwendige Ausmaß der Stromreduktion bei therapeutisch relevanten ETX-Konzentrationen nicht erreicht wurde. Ebenfalls im Kontrast zur klassischen Ansicht, dass die therapeutische Wirkung von ETX maßgeblich auf der Beeinflussung von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen beruht, konnten Leresche et al. (1998), Gross et al. (1997) und Sayer et al. (1993) keine bzw. nur eine teilweise Reduzierung von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen in thalamischen und nicht-thalamischen Neuronen in therapeutisch relevanten Konzentrationen nachweisen. Diese kontroversen, an verschiedenen Spezies erhobenen Befunde deuten auf eine ausgeprägte Abhängigkeit der Wirksamkeit von Ethosuximid vom gewählten Zellmodell hin. Dies stellt wiederum eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die ausbleibenden zellulären Effekte dieses Pharmakons in primären humanen Linsenepithelzellen dar. Neben seiner Wirkung auf spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme im Thalamus reduzierte Ethosuximid auch den persistierenden  $\text{Na}^+$ -Strom und den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Strom in kortikalen und Thalamus-Neuronen (Crunelli & Leresche 2002).

Gomora et al. (2001) wiesen die state-Abhängigkeit der T-Typ Kanalblockade durch ETX mit geringerer Kanalinhibition bei stark hyperpolarisierten Haltepotentialen nach. Damit lassen sich auch die kontroversen experimentellen Ergebnisse zur Inhibition von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch ETX (Coulter et al. 1989, Kostyuk et al. 1992, Todorovic & Lingle 1998) erklären, als deren Ursache zunächst eine Blockade weiterer Ionenkanäle angenommen worden war (Leresche et al. 1998). Auch im Hinblick auf die eigenen Befunde ist deshalb zu vermuten, dass die funktionelle Bedeutung von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -

Kanälen in hLEZ unter physiologischen Bedingungen (die Zellen erreichen unter Kulturbedingungen nicht so negative Ruhepotentiale wie experimentell erzwungen) wahrscheinlich eher gering ist und ETX in seiner Wirkung auf diesen Kanaltyp keine zellulären Konsequenzen verursacht, die das Wachstum, die Adhäsion und das Überleben der hLEZ nachhaltig negativ zu beeinflussen vermögen.

Weitere elektrophysiologische Untersuchungen könnten Auswirkungen von Ethosuximid auf  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Ströme erfassen und die vorliegenden experimentellen Aussagen erweitern. Im Zeitrahmen der Projektbearbeitung waren Versuche in dieser Richtung als Reaktion auf den Apoptosebefund nicht mehr möglich. Eine molekularbiologische Charakterisierung der in hLEZ exprimierten strukturellen T-Typ Kalziumkanal-Subtypen (s. Tab.2.3), hier aufgrund limitierter Primärzellzahlen nicht durchführbar, wäre ergänzend ebenfalls von Interesse.

#### L-Typ Kalzium-Antagonist Nifedipin

Der L-Typ-Kalziumkanal-Antagonist Nifedipin wurde für ausgewählte Experimente verwendet, um zu klären, ob die im Ergebnisteil (s. Kap.5.2-5.5, 5.6.1-5.6.4, 5.6.7) dargestellten zellulären Effekte von Mibefradil auf die Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle allgemein oder speziell vom T-Typ (s. Kap. 5.7) zurückzuführen sind.

Nifedipin gehört zur Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker vom 1,4-Dihydropyridin-Typ und wird seit 1975 v.a. zur Behandlung von essentieller Hypertonie und der stabilen Angina pectoris eingesetzt (Brogden & McTavish 1995, Frishman & Lazar 1988, Schulz et al. 1996). Kubota et al. (2001) wiesen in Abhängigkeit von der Art der Verabreichung (oral, sublingual, nasal) nach der Gabe von 10 mg Nifedipin Serum-Spitzenkonzentrationen von 10-70 ng/ml, d.h. 0,03  $\mu\text{M}$  bis 0,2  $\mu\text{M}$  nach.

Die offensichtlich sehr geringe Ausprägung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in hLEZ, gefolgt aus dem nicht oder nur sporadisch detektierbaren Strom mit entsprechenden L-typischen Eigenschaften, könnte auch einen plausiblen Erklärungsansatz für die im Fall der Nifedipin-Applikation ausbleibende Morphologieänderung, Fragmentierung des Aktinzytoskeletts und fehlende Apoptose-Induktion (s. Kap. 5.6.2) liefern. Das Fehlen einer antiproliferativen Aktivität von Nifedipin wird durch Yoshida et al. (2003, 2007) für die humane Epithelkarzinom-Zelllinie A431, in welcher keine L-Typ Kalziumkanäle exprimiert werden, bestätigt. Interessanterweise inhibieren Yoshida et al (2003, 2007) zufolge Kalzium-Kanalblocker mit antiproliferativer Wirkung in A431 Zellen (Dihydropyridin-Derivate wie Amlodipin, Nicardipin, Nimodipin) die Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum und den darauf folgenden speichergesteuerten Kalzium-Influx durch  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle in der Plasmamembran. Nifedipin

konnten diese Eigenschaften nicht nachgewiesen werden. Auf die vorliegenden Versuche übertragen, wäre die Hypothese daraus ein mangelnder Effekt von Nifedipin auf Adhäsion und Apoptose von hLEZ, weil die Voraussetzung, das Vorhandensein von L-Kanälen, nicht gegeben ist und Nifedipin in den verwendeten Konzentrationen nur spezifisch auf diesen Kanaltyp zu wirken scheint und zentrale Zellstrukturen nicht beeinträchtigt.

#### T-Typ Kalzium-Antagonist Mibefradil

In hLEZ bewirkt Mibefradil eine zeit- und dosisabhängige Fragmentation des F-Aktin-Zytoskeletts und DNA-Oligonukleotidabspaltung (s. Kap.5.6.4). Letzteres ist vor dem Hintergrund der beschriebenen Morphologieänderungen (s. Kap.5.2.1) als spätes Apoptosekennzeichen zu werten, wobei die TUNEL-Nachweismethode aufgrund limitierter Sensitivität und Spezifität (unzureichende Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose) besonders kritische Interpretation der Versuchsergebnisse erfordert (Grasl-Kraupp et al. 1995, Labat-Moleur et al. 1998). Eindeutig für eine Apoptose als der Mibefradilwirkung zugrunde liegendem Zelltodmechanismus spricht dagegen in Übereinstimmung mit Fischer et al. (2003) die Caspase-Aktivierung (s. Kap.5.6.3) in hLEZ und die Phosphatidylserin-Exposition auf der Zellmembranaussenseite („eat me“-Signal für Makrophagen; Criddle et al. 2007, Mattson & Chan 2003) in hLEZ und HLE-B3 Zellen (s. Kap.5.6.1). Da einmal exponiertes Phosphatidylserin auch während des weiteren Zelltodprozesses auf der Aussenseite verbleibt und die Zellmembran zunehmend ihre Barrierefunktion einbüßt, kann Annexin-V-FITC zusätzlich auch an auf der Membranınnseite befindliches Phosphatidylserin binden. Das bedeutet, diese Zellen haben entweder ein frühapoptotisches Stadium durchlaufen oder zeigen Annexin-V-FITC-positive Färbung aufgrund einer permeabilisierten Membran. Die Zellkompaktierung vor der Ablösung von hLEZ (s. Abb.5.10.) und die auch nach Mibefradil-Inkubation kaum veränderten HLE-B3-Streulichteigenschaften (s. Kap.5.4) stehen für den Erhalt der Membranintegrität. Zudem weist die nach 24 h 10 µM Mibefradil-Inkubation sichtbare Kolokalisation des proapoptotischen Proteins Bax mit den Mitochondrien (s. Kap.5.6.2) in hLEZ auf eine Mitochondrienbeteiligung im Apoptoseverlauf hin. Eine nukleäre Bax-Lokalisation in unbehandelten Zellen wie hier in hLEZ scheint kein Einzelfall zu sein, denn auch Nishita et al. (1998) beobachteten eine nukleäre Bax-Verteilung in verschiedenen humanen Lungenkarzinom-Zelllinien.

HLE-B3 Zellen erwiesen sich hinsichtlich der Apoptoseinduktion im Vergleich mit hLEZ als etwas weniger sensitiv gegenüber Mibefradil (s. Kap.5.6.1). Diese Tatsache ergibt

sich aus den gegenüber Primärzellen veränderten Zellineneigenschaften, wie z.B. dem Wachstumsverhalten. Während hLEZ größtenteils im Monolayer wachsen und nur vereinzelt Bilayer-Bereiche auftreten, ist die Kontaktinhibition bei HLE-B3 Zellen weitgehend aufgehoben und die Zellen wachsen im Multilayer. Infolge dessen sind die dem Medium nicht direkt angrenzenden Zelllayer gegen das darin gelöste Pharmakon vermehrt abgeschirmt.

Eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Zellmorphologie kommt dem Zytoskelett zu. Da viele Aktin-Zytoskelett-assoziierte Proteine in ihrer Funktion  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig sind, ist eine Überlappung verschiedener Mechanismen wahrscheinlich. Auch die nachgewiesene Aktivierung von Caspase-3 könnte eine Rolle für die durch Mibefradil hervorgerufene Reorganisation und schließlich den Abbau des F-Aktins in hLEZ spielen. In vitalen Zellen liegt inaktive Caspase-3 vor allem im Zytosol vor, während nach Apoptose-Stimulation eine teilweise Translokation in den Nukleus stattfindet (Zhivotovsky et al. 1999, Horky et al. 2001, van Loo et al. 2002). Zu den Caspase-3-Substraten zählt u.a. auch monomeres Aktin (G-Aktin; Stroh & Schulze-Osthoff 1998, Mashima et al. 1999, Kayalar et al. 1996, Fischer et al. 2003), welches für die Dynamik der Aktinfilamente (F-Aktin) unverzichtbar ist. So könnte durch Caspase-bedingten G-Aktin-Abbau zunächst das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Aktinfilamenten gestört werden. Über den resultierenden G-Aktinmangel oder indirekte Rückkopplung könnte im Anschluß der Abbau von F-Aktin ausgelöst werden. Auch wäre eine Beteiligung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen, Aktinzytoskelett-depolymerisierenden Gelsolins an Mibefradil-bedingten zellulären Effekten denkbar, denn die Aktivität spannungsabhängiger Kalziumkanäle kann dynamisch durch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts modifiziert werden. Derartige Zytoskelettmodulationen werden u.a. durch das Aktin-degradierende Protein Gelsolin vermittelt (Endres et al. 1999, Fink et al. 2002, Furukawa et al. 1997, Harms et al. 2004, Johnson & Byerly 1993, Rosenmund & Westbrook 1993). Fest steht, dass nach Mibefradil-Applikation eine Zytoskelett-Reorganisation aufgrund der innerhalb weniger Stunden messbaren Verringerung der Zellkontaktfläche als Ausdruck einer Zellformänderung einsetzt (s. Kap. 5.2.2), selbst wenn ein F-Aktin-Abbau frühestens nach 24 h (20  $\mu\text{M}$ ) Mibefradil-Einwirkung erkennbar ist (s. Kap. 5.6.4). Bei 10  $\mu\text{M}$  konnte ein F-Aktin-Abbau erst nach 48 h beobachtet werden. Diese Zellretraktion könnte durchaus über den reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die daraus folgende Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Meißner 2007) vermittelt werden. Zudem mehrten sich experimentelle Beweise für reziproke regulatorische Interaktionen zwischen Integrinen und Ionenkanälen (Arcangeli & Becchetti 2006). So wurden u.a. auch für

spannungsabhängige  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle derartige physische Wechselwirkungen nachgewiesen (Artym & Petty 2002, Shakibakei & Mobasheri 2003, Levite et al. 2000). In Endothelzellen regulieren Integrine Zell-Spreading und Migration, indem sie die zytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Konzentration kontrollieren (Leavesley et al. 1993, Schwartz 1993). Eine dergestaltige Interaktionsmöglichkeit wäre daher auch für Linsenepithelzellen denkbar, wobei über Modulation Aktin-bindender Proteine eine rasche Aktin-Zytoskelettorganisation und negative Rückkopplung zu Integrinen erfolgen und parallel über Proteine der MAPK-Kaskade (z.B. reduzierte ERK1/2-Aktivität; s. Meißner 2007, Meißner & Noack 2008) Signale in den Zellkern vermittelt werden könnten, die nicht nur einen Proliferationsstopp, sondern auch den Adhäsionsverlust und die Apoptoseinduktion auslösen. Einige Integrine, wie z.B. das in den primären Linsenepithelzellen vorrangig exprimierte  $\beta 1$ , welches die Bindung an Kollagen I vermittelt, können das Überleben von Zellen regulieren (Meredith et al. 1993). Die durch den Kontakt zur Kollagen I-Schicht stimulierten Überlebenssignale vermögen auch den verzögerten Apoptoseablauf zu erklären.

Da die prominente Stressfaserausbildung in kultivierten hLEZ Ausdruck eines "high-tensional state" der Zellen ist (Assoian & Klein 2008), könnte eine Mibefradil-bedingte Kalzium-Influx-Inhibition (analog zur relaxierenden Wirkung von  $Ca^{2+}$ -Antagonisten auf glatte Muskelzellen) zum Nachlassen der zellulären Spannungen führen. Die lichtmikroskopisch verfolgbaren Zellformänderungen von hLEZ ließen sich somit als Folge des Verlustes an Zellspannung interpretieren, hier einhergehend mit einer Reduzierung der Zellkontaktfläche als Anzeichen einer progressiven Zellaufrundung. Da aktivierte Myofibroblasten zum Abschluss der Wundheilung in vivo infolge nachlassender Zugspannung nach der Übernahme der mechanischen Belastung durch die reorganisierte EZM größtenteils durch Apoptose („stress release“-geförderte Apoptose) eliminiert werden (Carlson et al. 2003) und ein Nachlassen der Spannung in den Stressfasern zu sofortigem Kontraktionsverlust und zu Apoptose führt (Hinz 2007), könnten in den myofibroblasten-ähnlichen hLEZ ähnliche Mechanismen für das Anstoßen apoptotischer Prozesse verantwortlich sein. Eine Kausalkette könnte sich wie folgt darstellen: Integrin-EZM-Kontakt-Lockerung durch Mibefradil → Abbau von Fokalkontakten → Verlust an Zellspannung → Apoptose durch Zellablösung. Abschließend sei auch das im Vergleich zu anderen  $Ca^{2+}$ -Antagonisten ungewöhnlich hohe Interaktionspotential von Mibefradil (<http://www.infomed.org/pharma-kritik/pk07a-97.html>) und die große Anzahl seiner Metaboliten erwähnt. Diese Eigenschaften könnten den Zellstoffwechsel und intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen und mit zur Apoptoseinduktion beitragen.

Das Zytoskelett kann als Mechanotransduktor in biochemische Signale dienen, unter Beteiligung von Tyrosinphosphatase- und -Kinase-Wegen (Giannone & Sheetz 2006). Der gebräuchlichste Myofibroblastenmarker,  $\alpha$ -SMA, kann als mechanosensitives Protein angesehen werden (Goffin et al. 2006, Wang et al. 2006). Die durch mechanische Kräfte induzierte Phosphorylierung der mitogen activated protein kinase p38 scheint von einem  $\alpha$ -SMA-abhängigen Signalübertragungsweg abhängig zu sein, wobei Belastungs-induzierte  $\alpha$ -SMA-Expression synergistisch mit p38-Aktivierung einhergeht (Giannone & Sheetz 2006). Da  $\alpha$ -SMA in der Mehrzahl der hier untersuchten hLEZ exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass Mibefradil möglicherweise über Wechselwirkungen mit diesem oder anderen auf das Aktinzytoskelett wirkenden Proteinen eine Entspannung der Stressfasern auslöst, die zu einer Umorganisation des F-Aktins innerhalb der Zelle führt, möglicherweise verbunden mit Lockerung Integrin-vermittelter Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Kontakte und daraus zwangsläufig resultierender Öffnung irregulär exprimierter Tight Junctions (s. Kap. 5.3.1 und 5.3.4). Zell-Adhäsions-Signaling via Focal Adhesion Kinase (FAK) stellt einen weiteren Weg dar, durch den biochemische und biophysikalische EZM-Signale sowie Wachstumsfaktorsignale integriert werden (Goffin et al 2006, Thannickal et al 2003). Dabei kann die Remodellierung der extrazellulären Matrix über EZM-Rezeptor-vermittelte Signale (z.B. über Integrine, Syndecane u.a.) oder EZM-modifizierende Proteine (z.B. Matrixmetalloproteinasen) erfolgen. Diese Remodellierung steht in Wechselbeziehung zu extrazellulärer und zellulärer Spannung und kann diese sowohl induzieren als auch selbst von ihr beeinflusst werden (Daley et al. 2008). Während TGF- $\beta_1$ -stimulierter Fibroblasten-Transformation zu Myofibroblasten vermittelt Fibronectin auch Rho-stimulierte Zellkontraktion (Clark et al. 1997, Meckmongkol et al. 2007). Fibronectin stimulierte in Versuchsmodellen von Bernstein et al. (2007) die Migration von Fibroblasten, Myofibroblasten und Makrophagen und u.a. auch die Deposition von Kollagen I zur Ermöglichung eines Wundverschlusses. Integrin-Bindung an Kollagen I initiiert ein Überlebenssignal, welches Hauptvermittler des Integrin-Signalings wie FAK, PI3K und Akt/PKB involviert (Tian et al. 2002, Xia et al. 2004). Matrixkontraktion konvertiert dieses Überlebenssignal über Integrin-Mechanotransduktion und Akt-Inaktivierung in ein pro-apoptotisches Signal (Tian et al. 2002, Xia et al. 2004). Auf diese Weise kann die über Integrine vermittelte EZM-Spannung das Überleben von Zellen während der Wundheilung regulieren (Daley et al. 2008).

Der wichtigste Myofibroblast-Induktor TGF- $\beta_1$  z.B. steigert die Fibronectin-Expression und die seines Rezeptors in Lungen-Fibroblasten, welches eng mit der Aktivierung / Phosphorylierung der FAK, essenziell für Myofibroblast-Transformation verbunden ist

(Thannickal et al 2003). Weiterhin zeigten Strobeck et al (1999) in Untersuchungen an Swiss 3T3 Zellen eine Beteiligung des MAPK-Signalweges an der Induktion einer „spindle-shape“-Morphologie. Weiterführende Experimente zur Integrin-Aktinzytoskelett-Interaktion könnten Argumente für oder gegen eine Anoikis-Hypothese liefern. Untersuchungen von Mace et al. (2007) an Enterozyten unterstützen die eigene Vermutung, dass die Inhibition des Kalzium-Einstroms funktionell mit Veränderungen des membranständigen Zytoskelett-Netzwerkes verknüpft ist. Denn Entzug extrazellulären Kalziums oder Inhibition der unidirektionalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Absorption durch Nifedipin führte experimentell zu einer deutlich geringeren Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosin-II im terminalen Netzwerk. Daraus folgerten die Autoren, dass das für die Myosin-II-Kontraktion notwendige  $\text{Ca}^{2+}$  über einen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in die Zelle einströmt. Dieser Befund würde mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts in hLEZ nach Mibefradil-Zugaben übereinstimmen, hier jedoch unter der Prämisse der vorrangigen Beteiligung von T-Kanälen.

Die Beeinflussung von Ionenkanälen muss zwangsläufig Auswirkungen auf den Ionenhaushalt und damit die Volumenregulation der Zelle haben.

Experimentell konnte neben der T-Typ Kalziumeinstrom-Blockade innerhalb weniger Minuten eine nahezu vollständige Inhibition des spannungsabhängigen  $\text{K}^{+}$ -Auswärtsstromes in kultivierten hLEZ ab  $10^{-6}$  M Mibefradil nachgewiesen werden.  $\text{K}^{+}$  ist maßgeblich für den Aufbau und Erhalt des Membranpotentials und des Ionengleichgewichts der Zelle verantwortlich. Die  $\text{IC}_{50}$  von Mibefradil für T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle liegt im Bereich  $\leq 10^{-6}$  M (Wu et al. 2000, Nilius et al. 1997, Strobeck et al. 1999), und in diesem Dosisbereich wurden bereits parallel u.a.  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte sowie Volumen-aktivierte  $\text{Cl}^{-}$ -Kanäle inhibiert (Nilius et al. 1997).

Für  $\text{K}^{+}$ - und  $\text{Cl}^{-}$ -Kanalblocker ist eine Inhibition der regulatorischen Volumenabnahme (regulatory volume decrease – RVD) und ebenso der apoptotischen Volumenabnahme (apoptotic volume decrease – AVD) in RTH-149 Zellen nachgewiesen worden (Krumnschnabel et al. 2007). Bereits die Hemmung eines für die Volumenregulation essentiellen Ionenkanals könnte den antiproliferativen Effekt von Mibefradil (s. Kap.5.6.7) erklären, denn auch andere  $\text{Cl}^{-}$ -Kanal-Inhibitoren wie DIDS und NPPB hemmen zugleich die Proliferation (Wondergem et al. 2001, Phipps et al. 1996) und RVD (Yu & Sokabe 1997, Civan et al. 1992). Eine anhaltende Zellvolumenreduktion wird nicht nur als bedeutendes Apoptose-Kennzeichen, sondern auch als frühe Vorbedingung angesehen (Okada & Maeno 2001). Das Verhindern eines  $\text{K}^{+}$ - und  $\text{Cl}^{-}$ -Effluxes kann Zellen entsprechend vor Apoptose bewahren (Maeno et al. 2000, Okada et al. 2004). Dementgegen findet in den vorliegenden Untersuchungen in hLEZ unter

Mibefradil-Einwirkung ein apoptotisch geprägter Zelltod statt, wobei die experimentell nachgewiesene Verringerung der Kontaktfläche (s. Kap.5.2.2) keine Aussage über Zellvolumenänderungen zulässt. Jedoch sprechen die durchflusszytometrisch bestimmten, auch nach Mibefradil-Einwirkung unveränderten Streulichteigenschaften von HLE-B3 Zellen tendenziell gegen eine Volumenabnahme. Das lässt eine multiple Wirkung von Mibefradil auch auf Ebene des Ionenhaushalts von Zellen vermuten. Vorstellbar ist etwa ein Herabsetzen der Funktion von Ionenpumpen wie der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, welche hauptsächlich in den Linsenepithelzellen und den oberflächlichen Rindenfaserzellen nachzuweisen sind (Gorthy & Anderson 1980, Iwata 1985). Die Zellvolumenregulation der Linse erfolgt vor allem durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, welche die höchste Aktivität in äquatorialen Linsenepithelzellen aufweist (Davidson & Nelms 1999, Delamere & Tamiya 2004, Paterson & Delamere 2004).

## Fazit

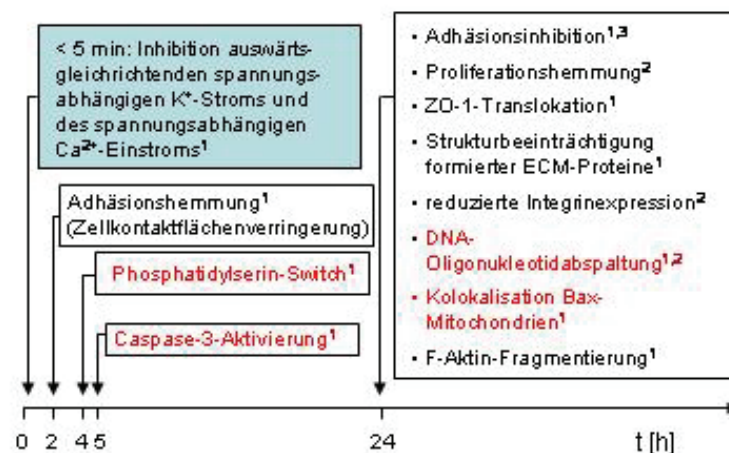


Abb.6.2. Zusammenfassung der Mibefradil-induzierten zellulären Effekte in hLEZ. <sup>1)</sup> in hLEZ, <sup>2)</sup> in HLE-B3 Zellen bzw. <sup>3)</sup> primären humanen Hornhaut-Endothelzellen nachgewiesene Auswirkungen. Blau unterlegt: elektrophysiologische Befunde; rote Schrift: Apoptose-Nachweise.

Zusammengefasst sind allein die Auswirkungen, die Mibefradil allein auf das empfindliche Ionengleichgewicht der Zelle hat, dramatisch genug, um eine Apoptose-Einleitung als Konsequenz zu erklären. Im Anschluss an die Ionenstromblockade werden intrazelluläre Signalwege moduliert und adhäsionsrelevante Zellstrukturen hemmend beeinflusst, was schließlich in einen apoptotisch geprägten Zelltod mündet (s. Abb.6.2.). Die antiproliferativen und apoptoseinduzierenden Eigenschaften dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten lassen ihn unter abgeschlossenen räumlichen Bedingungen für Nachstarprävention geeignet erscheinen.



## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des ursprünglich als selektiv für T-Typ Ca-Kanäle ausgewiesenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Mibefradil auf Kalzium-abhängige Zellprozesse wie Adhäsion und Proliferation in Zellkulturexperimenten an humanen Linsenepithelzellen untersucht. Den klinischen Hintergrund bildete die Suche nach neuen Ansätzen zur Prävention der proliferationsbedingten sekundären Katarakt in der Augenheilkunde.

Die hier erstmals nachgewiesene Präsenz von T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen in proliferierenden primären humanen Linsenepithelzellen bietet dabei die Voraussetzung für eine gezielte Beeinflussung Kalzium-abhängiger Vorgänge mit dem Ziel der Verhinderung von Proliferation und Migration.

Mibefradil zeigte sich in den dargestellten Experimenten in der Lage, Komponenten der Extrazellulären Matrix (Kollagene, Fibronectin, Laminin), Zell-Matrix-Adhäsion (Integrine), Zell-Zell-Adhäsion (Tight junctions), des Zytoskeletts (F-Aktin) und grundlegende Prozesse wie Zellwachstum und Zellteilung sowie die Überlebensfähigkeit von Zellen entscheidend zu beeinflussen. Der inhibitorische Effekt von Mibefradil auf diese Zellfunktionen ist dosis- und zeitabhängig. Elektrophysiologisch konnte neben der Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle auch die Inhibition eines auswärts gerichteten, verzögert gleichrichtenden Kaliumstromes nachgewiesen werden. Weitere Ionenkanäle wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Mibefradil auch die Funktion weiterer Ionenkanäle moduliert, welches Konsequenzen für die Volumenregulation der Zelle hat.

Die Adhäsionsinhibition ist deshalb als Folge einer Ionenkanalblockade in Kombination mit der parallelen Beeinflussung von Integrin-vermittelten Zellfunktionen anzusehen.

Im verwendeten Konzentrationsbereich induzierte der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonist Mibefradil sowohl in primären Linsenepithelzellen als auch in der Zelllinie HLE-B3 Apoptose. Mibefradil scheint damit  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zellvorgänge zumindest teilweise über einen reduzierten Kalziumeinstrom in die Zelle zu modulieren. Die Mibefradil-induzierte Apoptose scheint aufgrund nachgewiesener Bax- und Caspase-3-Aktivierung Mitochondrien-abhängig abzulaufen. Es ist jedoch wegen der Komplexität der Zellantwort und der Vielzahl betroffener Zellstrukturen zu erwarten, dass mehr als nur ein Apoptose-Signalweg beteiligt ist.

Der alternative T-Kanalblocker Ethosuximid und der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonist Nifedipin erzielten demgegenüber keine apoptotische Wirkung und induzierten ebenso keine

Adhäsionsinhibition. Ursachen hierfür sind in der zu geringen Expression von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen im Fall Nifedipin einerseits und einer offenbar Zellmodell-abhängig schwankenden Wirksamkeit hinsichtlich Ethosuximid andererseits zu vermuten.

Weitere Experimente zur Expression von Schlüsselproteinen zentraler Signaltransduktionswege könnten die Erkenntnisse hinsichtlich  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger Effekte erweitern. Eine klinische Nutzung der antiproliferativen Eigenschaften des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Mibefradil zur Machstarprävention erscheint unter geeigneten Bedingungen, d.h. einer immobilisierten Anwendungsform im abgedichteten Kapselsack nicht ausgeschlossen.

## 8 Literatur

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P: Molekularbiologie der Zelle. Weinheim, Wiley-VCH, 2004, 1801 S.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Weinheim, Wiley-VCH, 2005, 908 S.
- Antoniotti S, Fiorio Pla A, Pregnotato S, Mottola A, Lovisolo D, Munaron L: Control of endothelial cell proliferation by calcium influx and arachidonic acid metabolism: a pharmacological approach. *J Cell Physiol.* 197(3): 370-8 (2003).
- Apple DJ, Rabb MF (eds): Lens and pathology of intraocular lenses. - In: Apple, DJ., Rabb, MF: Ocular Pathology. Clinical Applications and Self-Assessment. Mosby, St. Louis, 1998, pp 117-204.
- Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, Assia EI, Holland EY, Legler UF, Tsai JC, Castaneda VE, Hoggatt JP, Kostick AM: Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol.* 37: 73-116 (1992).
- Apple DJ: Influence of intraocular lens material and design on postoperative intracapsular cellular reactivity. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 98: 257-83 (2000).
- Arcangeli A, Becchetti A: Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol.* 16: 631-9 (2006).
- Artym VV, Petty HR: Molecular proximity of Kv1.3 voltage-gated potassium channels and beta(1)-integrins on the plasma membrane of melanoma cells: effects of cell adherence and channel blockers. *J Gen Physiol.* 120: 29-37 (2002).
- Assoian RK, Klein EA: Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol.* 18: 347-52 (2008).
- Auffarth GU (Hrsg.): Kataraktchirurgie. Universitäts-Augenklinik Heidelberg, UNI-MED Science, 2008, 128 S.
- Auffarth GU, Nimsgern C, Tetz MR, Krastel H, Völcker HE: Erhöhte Nachstarrate und Besonderheiten der ND-YAG-Laserkapsulotomie bei Retinitis pigmentosa. *Ophthalmologe.* 94: 791-5 (1997).
- Auffarth GU, Rabsilber TM, Reuland AJ: Neue Methoden der Nachstarprävention. *Ophthalmologe.* 102: 579-86 (2005).
- Auffarth GU, Völcker HE: Zur Morphologie und Histopathologie der Cataracta secundaria. In: Demeler U, Völcker HE, Auffarth GU (Hrsg.): Kongressband: 15. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen Implantation und refraktive Chirurgie, Bremen Biermann Verlag (2001) S.381-384.
- Azuma N, Hara T, Hara T: Extracellular matrix of opacified anterior capsule after endocapsular cataract surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 236: 531-6 (1998).
- Beck R, Nebe B, Guthoff R, Rychly J: Inhibition of lens epithelial cell adhesion by the calcium antagonist Mibefradil correlates with impaired integrin distribution and

- organization of the cytoskeleton. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 239: 452-8 (2001).
- Berman AE, Kozlova NI, Morozovich GE: Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc).* 68: 1284-99 (2003).
- Bernardi P, Rasola A: Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem.* 45: 481-506 (2007).
- Bernstein AM, Twining SS, Warejcka DJ, Tall E, Masur SK: Urokinase receptor cleavage: a crucial step in fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Mol Biol Cell.* 18: 2716-27 (2007).
- Berridge MJ: The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 32: 235-49 (2002).
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 517-29 (2003).
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P: Calcium--a life and death signal. *Nature.* 395: 645-8 (1998).
- Bertelmann E, Kojetinsky C: Posterior capsule opacification and anterior capsule opacification. *Curr Opin Ophthalmol.* 12: 35-40 (2001).
- Bertolesi GE, Shi C, Elbaum L, Jollimore C, Rozenberg G, Barnes S, Kelly ME: The Ca(2+) channel antagonists mibefradil and pimozide inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Mol Pharmacol.* 62: 210-9 (2002).
- Bezprozvanny I, Tsien RW: Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca<sup>2+</sup> channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol Pharmacol.* 48: 540-9 (1995).
- Bezprozvanny I: The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium.* 38: 261-72 (2005).
- Bianchi K., Rimessi A., Prandini A., Szabadkai G. and Rizzuto R: Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim. Biophys. Acta.* 1742: 119–131 (2004).
- Brakebusch C, Fässler R: The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* 22: 2324-33 (2003).
- Brogden RN, McTavish D: Nifedipine gastrointestinal therapeutic system (GITS). A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in hypertension and angina pectoris. *Drugs.* 50: 495-512 (1995).
- Broicher T, Seidenbecher T, Meuth P, Munsch T, Meuth SG, Kanyshkova T, Pape HC, Budde T: T-current related effects of antiepileptic drugs and a Ca<sup>2+</sup> channel antagonist on thalamic relay and local circuit interneurons in a rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology.* 53: 431-46 (2007).
- Browne TR, Dreifuss FE, Dyken PR, Goode DJ, Penry JK, Porter RJ, White BG, White PT: Ethosuximide in the treatment of absence (petit mal) seizures. *Neurology.* 25: 515-24 (1975).
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M: Focal adhesions, contractility, and signaling.

- Annu Rev Cell Dev Biol. 12: 463-518 (1996).
- Calderwood DA: Integrin activation. J Cell Sci. 117: 657-66 (2004).
- Caporossi A, Casprini F, Tosi GM, Balestrazzi A, Stumpo M, Toti P: Histology of anterior capsule fibrosis following phacoemulsification. J Cataract Refract Surg. 24: 1343-6 (1998).
- Carafoli E: The ambivalent nature of the calcium signal. J Endocrinol Invest. 27: 134-6 (2004).
- Carafoli E: Calcium - a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. FEBS J. 272: 1073-89 (2005).
- Carafoli E, Brini M: Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. Curr. Opin. Chem. Biol. 4: 152-161 (2000).
- Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M: Generation, control and processing of cellular calcium signals. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 36: 107-260 (2001).
- Carlson MA, Longaker MT, Thompson JS: Wound splinting regulates granulation tissue survival. J Surg Res. 110: 304-9 (2003).
- Cary LA, Han DC, Guan JL: Integrin-mediated signal transduction pathways. Histol Histopathol. 14: 1001-9 (1999).
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J: International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol Rev. 57: 411-25 (2005).
- Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E: International Union of Pharmacology. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. Pharmacol Rev. 55: 579-81 (2003).
- Catterall WA: Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Annu Rev Cell Dev Biol. 16: 521-55 (2000).
- Catterall WA: Structure and function of voltage-gated ion channels. Annu Rev Biochem. 64: 493-531 (1995).
- Catterall WA, Seagar MJ, Takahashi M: Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. J Biol Chem. 263(8): 3535-8 (1988).
- Catterall WA, Curtis BM: Molecular properties of voltage-sensitive calcium channels. Soc Gen Physiol 41:201-213 (1987).
- Chemin J, Monteil A, Briquaire C, Richard S, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P: Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. FEBS Lett. 478: 166-72 (2000).
- Chen CF, Corbley MJ, Roberts TM, Hess P: Voltage-sensitive calcium channels in normal and transformed 3T3 fibroblasts. Science. 239: 1024-6 (1988).
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR: Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. Cell Death

- Differ. 13: 1396-402 (2006).
- Chu CL, Reenstra WR, Orlow DL, Svoboda KK: Erk and PI-3 kinase are necessary for collagen binding and actin reorganization in corneal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 3374-82 (2000).
- Churchill GC, Okada Y, Thomas JM, Genazzani AA, Patel S, Galione A: NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* 111: 703–708 (2002).
- Civan MM, Peterson-Yantorno K, Coca-Prados M, Yantorno RE: Regulatory volume decrease by cultured non-pigmented ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res.* 54: 181-91 (1992).
- Clark RA, McCoy GA, Folkvord JM, McPherson JM: TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J Cell Physiol.* 170: 69-80 (1997).
- Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI: Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J Hypertens Suppl.* 15: S17-25 (1997).
- Clozel JP, Véniant M, Osterrieder W: The structurally novel Ca<sup>2+</sup> channel blocker Ro 40-5967, which binds to the [3H] desmethoxyverapamil receptor, is devoid of the negative inotropic effects of verapamil in normal and failing rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther.* 4: 731-6 (1990).
- Cook SJ, Lockyer PJ: Recent advances in Ca(2+)-dependent Ras regulation and cell proliferation. *Cell Calcium.* 39: 101-12 (2006).
- Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA: Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann Neurol.* 25: 582-93 (1989).
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E: Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ Res.* 83: 103-9 (1998).
- Cribbs LL: T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium.* 40(2): 221-30 (2006).
- Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV: Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ.* 14: 1285-94 (2007).
- Crunelli V, Leresche N: Block of thalamic T-type Ca<sup>2+</sup> channels by ethosuximide is not the whole story. *Epilepsy Curr.* 2: 53-56 (2002).
- Daley WP, Peters SB, Larsen M: Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 121: 255-64 (2008).
- Dana MR, Chatzistefanou K, Schaumberg DA, Foster CS: Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with uveitis. *Ophthalmology.* 104: 1387-94 (1997).

- Danen EH: Integrins: regulators of tissue function and cancer progression. *Curr Pharm Des.* 11: 881-91 (2005).
- Davidson MG, Nelms SR: Diseases of the lens and cataract formation. In: Gelatt KN, (ed): *Veterinary ophthalmology*. Philadelphia (PA): Lippincott, Williams &Wilkins, (1999), pp.797–825.
- de longh RU, Wederell E, Lovicu FJ, McAvoy JW: Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs.* 179: 43-55 (2005).
- Delamere NA, Tamiya S: Expression, regulation and function of Na,K-ATPase in the lens. *Prog Retin Eye Res.* 23: 593-615 (2004).
- Devarajan P, Scaramuzzino DA, Morrow JS: Ankyrin binds to two distinct cytoplasmic domains of Na,K-ATPase alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 2965-9 (1994).
- Dewey J, Bartling C, Rae JL: A non-enzymatic method for lens decapsulation which leaves the epithelial cells attached to the fibers. *Curr Eye Res.* 14: 357-62 (1995).
- D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF: Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci.* 16: 246-50 (1991).
- Duncan G, Wormstone IM, Liu CS, Marcantonio JM, Davies PD: Thapsigargin-coated intraocular lenses inhibit human lens cell growth. *Nat Med.* 3: 1026-8 (1997).
- Duncan G: Role of membranes in controlling ion and water movements in the lens. *Ciba Found. Symp.* 19: 99-116 (1973).
- Ediger TR, Kraus WL, Weinman EJ, Katzenellenbogen BS: Estrogen receptor regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factor. *Endocrinology.* 140: 2976-82 (1999).
- Ehrhardt AG, Frankish N, Isenberg G: A large-conductance K<sup>+</sup> channel that is inhibited by the cytoskeleton in the smooth muscle cell line DDT1 MF-2. *J Physiol.* 496: 663-76 (1996).
- Eller P, Berjukov S, Wanner S, Huber I, Hering S, Knaus HG, Toth G, Kimball SD, Striessnig J: High affinity interaction of mibefradil with voltage-gated calcium and sodium channels. *Br J Pharmacol.* 130: 669-77 (2000).
- Endres M, Fink K, Zhu J, Stagliano NE, Bondada V, Geddes JW, Azuma T, Mattson MP, Kwiatkowski DJ, Moskowitz MA: Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke. *J Clin Invest.* 103: 347-54 (1999).
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA: Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25: 533-5 (2000).
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC: Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 20: 929-35 (2000).
- Estacion M, Mordan LJ: Expression of voltage-gated calcium channels correlates with



- PDGF-stimulated calcium influx and depends upon cell density in C3H 10T1/2 mouse fibroblasts. *Cell Calcium*. 14: 161-71 (1993).
- Etienne-Manneville S, Hall A: Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420: 629-35 (2002).
- Fink KB, Paehr M, Djoufack PC, Weissbrich C, Bösel J, Endres M: Effects of cytoskeletal modifications on Ca<sup>2+</sup> influx after cerebral ischemia. *Amino Acids*. 23: 325-9 (2002).
- Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 10: 76-100 (2003).
- Frisch SM, Ruoslahti E: Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*. 9: 701-6 (1997).
- Frisch SM, Screaton RA: Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 13: 555-62 (2001).
- Frishman WH, Lazar EJ: Calcium channel blockers in patients with both hypertension and angina pectoris. *J Cardiovasc Pharmacol*. 12: S69-74 (1988).
- Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP: The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 17: 8178-86 (1997).
- Gajkowska B, Motyl T, Olszewska-Badarczuk H, Godlewski MM: Expression of BAX in cell nucleus after experimentally induced apoptosis revealed by immunogold and embedment-free electron microscopy. *Cell Biol Int*. 25: 725-33 (2001).
- Gajkowska B, Wojewódzka U, Gajda J: Translocation of Bax and Bid to mitochondria, endoplasmic reticulum and nuclear envelope: possible control points in apoptosis. *J Mol Histol*. 35: 11-9 (2004).
- Galione A, Ruas M: NAADP receptors. *Cell Calcium*. 38: 273-80 (2005).
- Garratt AN, Humphries MJ: Recent insights into ligand binding, activation and signalling by integrin adhesion receptors. *Acta Anat (Basel)*. 154: 34-45 (1995).
- Gerasimenko O, Gerasimenko J: New aspects of nuclear calcium signalling. *J Cell Sci*. 117: 3087-94 (2004).
- Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T: Mitochondrial Ca(2+) as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ*. 14: 1267-74 (2007).
- Giannone G, Sheetz MP: Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol*. 16: 213-23 (2006).
- Giorgi C, Romagnoli A, Pinton P, Rizzuto R: Ca(2+) signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med*. 8: 119-30 (2008).
- Ginsberg MH, Loftus JC, Plow EF. Cytoadhesins, integrins, and platelets. *Thromb Haemost*. 59(1):1-6 (1988).
- Glossmann H, Striessnig J: Molecular properties of calcium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 114:1-105 (1990).
- Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B: Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol*. 172: 259-68 (2006).

- Gomora JC, Daud AN, Weiergräber M, Perez-Reyes E: Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol.* 60: 1121-32 (2001).
- Gomora JC, Enyeart JA, Enyeart JJ: Mibefradil potently blocks ATP-activated K(+) channels in adrenal cells. *Mol Pharmacol.* 56: 1192-7 (1999).
- Gorthy WC, Anderson JW: Special characteristics of the polar regions of the rat lens: morphology and phosphatase histochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 19: 1038-52 (1980).
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D: The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 10779-84 (1996).
- Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R: In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* 21:1465-8 (1995).
- Green WR, McDonnell PJ: Opacification of the posterior capsule. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 104: 727-39 (1985).
- Greenburg G, Hay ED: Cytodifferentiation and tissue phenotype change during transformation of embryonic lens epithelium to mesenchyme-like cells in vitro. *Dev Biol.* 115: 363-79 (1986).
- Grehn F: *Augenheilkunde: mit 20 Tabellen.* Heidelberg, Springer Medizin, 2006, 552 S.
- Gross RA, Covey DF, Ferrendelli JA: Voltage-dependent calcium channels as targets for convulsant and anticonvulsant alkyl-substituted thiobutylolactones. *J Pharmacol Exp Ther.* 280: 686-94 (1997).
- Guerini D, Coletto L, Carafoli E: Exporting calcium from cells. *Cell Calcium.* 38: 281-9 (2005).
- Gumbiner BM: Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6: 622-34 (2005).
- Halbleib JM, Nelson WJ: Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20: 3199-214 (2006).
- Hall A, Nobes CD: Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355: 965-70 (2000).
- Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279: 509-14 (1998).
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391: 85-100 (1981).
- Hamilton SL: Ryanodine receptors. *Cell Calcium.* 38: 253-60 (2005).
- Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S: Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature.* 379: 91-6 (1996).

- Hara T, Azuma N, Chiba K, Ueda Y, Hara T: Anterior capsular opacification after endocapsular cataract surgery. *Ophthalmic Surg.* 23: 94-8 (1992).
- Harms C, Bösel J, Lautenschlager M, Harms U, Braun JS, Hörtnagl H, Dirnagl U, Kwiatkowski DJ, Fink K, Endres M: Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Mol Cell Neurosci.* 25: 69-82 (2004).
- Hehlhans S, Haase M, Cordes N: Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta.* 1775: 163-80 (2007).
- Hemler ME: Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol Today.* 9: 109-13 (1988).
- Henriquez M, Armisen R, Stutzin A, Quest AF: Cell death by necrosis, a regulated way to go. *Curr Mol Med.* 8: 187-206 (2008).
- Hermesmeyer K: Role of T channels in cardiovascular function. *Cardiology.* 89: S2-9 (1998).
- Hille B: Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 3. edition, 2001, 814 pp.
- Hinz B: Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 127: 526-37 (2007).
- Hodgkinson LM, Duncan G, Wang L, Pennington CJ, Edwards DR, Wormstone IM: MMP and TIMP expression in quiescent, dividing, and differentiating human lens cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 4192-9 (2007).
- Hollick EJ, Spalton DJ, Meacock WR: The effect of capsulorhexis size on posterior capsular opacification: one-year results of a randomized prospective trial. *Am J Ophthalmol.* 128: 271-9 (1999).
- Horky M, Wurzer G, Kotala V, Anton M, Vojtěšek B, Vácha J, Wesierska-Gadek J: Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J Cell Sci.* 114: 663-70 (2001).
- Hsu YT, Youle RJ: Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem.* 273: 10777-83 (1998).
- <http://www.infomed.org/pharma-kritik/pk07a-97.html>
- <http://www.katarakt.net/html/pco.htm>, 1.7.2006
- <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Kataraktchirurgie-und-Intraokularlinsen.8882.0.html>; Universitätsaugenklinik Heidelberg: Patienteninformationen. Kataraktchirurgie und Intraokularlinsen. Stand 18.11.2008
- <http://www.toxcenter.de/stoff-infos/n/nifedipin.pdf>, Stand 6.7.2008.
- Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, Hansen JB, Taylor JT, Zhuang H, Zhang M, Ragsdale DS, Li M: NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 309: 193-9 (2004).
- Hynes RO: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48: 549-54 (1987).

- Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69: 11-25 (1992).
- Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110: 673-87 (2002).
- Ikura M, Osawa M, Ames JB: The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays*. 24: 625-36 (2002).
- Ingber DE: Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 1472-4 (2003).
- Ionides A, Dowler JG, Hykin PG, Rosen PH, Hamilton AM: Posterior capsule opacification following diabetic extracapsular cataract extraction. *Eye*. 8: 535-7 (1994).
- Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W, Takai Y: Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Semin Cell Dev Biol*. 15: 643-56 (2004).
- Ishibashi T, Araki H, Sugai S, Tawara A, Ohnishi Y, Inomata H: Anterior capsule opacification in monkey eyes with posterior chamber intraocular lenses. *Arch Ophthalmol*. 111: 1685-90 (1993).
- Iwata S: Calcium-pump and its modulator in the lens: a review. *Curr Eye Res*. 4: 299-305 (1985).
- Iwig M, Lasch J, Glaesser D: Growth regulation of lens epithelial cells. Chemically-modified sepharose as a suitable substratum for studying cell-substratum interactions. *Cell Differ*. 9: 1-12 (1980).
- Jaggar JH, Nelson MT: Differential regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks and  $\text{Ca}^{2+}$  waves by UTP in rat cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 279(5): C1528-39 (2000).
- Jeong SY, Seol DW: The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*. 41: 11-22 (2008).
- Jing J, Peretz T, Singer-Lahat D, Chikvashvili D, Thornhill WB, Lotan I: Inactivation of a voltage-dependent  $\text{K}^{+}$  channel by beta subunit. Modulation by a phosphorylation-dependent interaction between the distal C terminus of alpha subunit and cytoskeleton. *J Biol Chem*. 272: 14021-4 (1997).
- Johnson BD, Byerly L: A cytoskeletal mechanism for  $\text{Ca}^{2+}$  channel metabolic dependence and inactivation by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Neuron*. 10: 797-804 (1993).
- Joo CK, Lee EH, Kim JC, Kim YH, Lee JH, Kim JT, Chung KH, Kim J: Degeneration and transdifferentiation of human lens epithelial cells in nuclear and anterior polar cataracts. *J Cataract Refract Surg*. 25: 652-8 (1999).
- Kahl CR, Means AR: Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev*. 24: 719-36 (2003).
- Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M: Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*. 68: 459-86 (1999).

- Kappelhof JP, Vrensen GF: The pathology of after-cataract. A minireview. *Acta Ophthalmol Suppl.* 205: 13-24 (1992).
- Karp G: *Molekulare Zellbiologie*. Übersetzt von S Vogel, S Kuhlmann-Krieg, K Beginnen. Berlin, Springer, 2005, 1000 S.
- Kass GE, Juedes MJ, Orrenius S: Cyclosporin A protects hepatocytes against prooxidant-induced cell killing. A study on the role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  cycling in cytotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 44: 1995-2003 (1992).
- Kass GE, Orrenius S: Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect.* 107: 25-35 (1999).
- Katayama Y, Kobayakawa S, Yanagawa H, Tochikubo T: The relationship between the adhesion characteristics of acrylic intraocular lens materials and posterior capsule opacification. *Ophthalmic Res.* 39: 276-81 (2007).
- Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE: Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 2234-8 (1996).
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE: The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 427: 360-4 (2004).
- Klugbauer N, Marais E, Hofmann F: Calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr.* 35: 639-47 (2003).
- Kobrin I, Bieska G, Charlon V, Lindberg E, Pordy R: Anti-anginal and anti-ischemic effects of mibefradil, a new T-type calcium channel antagonist. *Cardiology.* 89: 23-32 (1998).
- Komuro H, Rakic P: Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science.* 257(5071): 806-9 (1992).
- Kostyuk PG, Molokanova EA, Pronchuk NF, Savchenko AN, Verkhratsky AN: Different action of ethosuximide on low- and high-threshold calcium currents in rat sensory neurons. *Neuroscience.* 51: 755-8 (1992).
- Kotturi MF, Carlow DA, Lee JC, Ziltener HJ, Jefferies WA: Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 278(47): 46949-60 (2003).
- Krishna R, Meisler DM, Lowder CY, Estafanous M, Foster RE: Long-term follow-up of extracapsular cataract extraction and posterior chamber intraocular lens implantation in patients with uveitis. *Ophthalmology.* 105: 1765-9 (1998).
- Krumschnabel G, Maehr T, Nawaz M, Schwarzbaum PJ, Manzl C: Staurosporine-induced cell death in salmonid cells: the role of apoptotic volume decrease, ion fluxes and MAP kinase signaling. *Apoptosis.* 12: 1755-68 (2007).
- Kübler-W, Tritthart-H (eds). *Calciumantagonisten*. Forschung und Klinik, Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft. Darmstadt, Steinkopff, 1996, 377 S.
- Kubota R, Komiyama T, Shimada H: Evaluation of the method for nifedipine administration for a rapid onset of clinical effect: a clinical study in normal

- volunteers. *Yakugaku Zasshi*. 121: 355-64 (2001).
- Küchle M, Amberg A, Martus P, Nguyen NX, Naumann GO: Pseudoexfoliation syndrome and secondary cataract. *Br J Ophthalmol*. 81(10): 862-6 (1997).
- Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A: Cell cycle--dependent expression of L- and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res*. 79:14-9 (1996).
- Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T, Negishi K: Growth factors influence contractility and alpha-smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36: 1701-8 (1995).
- Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T: Presence of alpha smooth muscle actin in lens epithelial cells of aphakic rabbit eyes. *Br J Ophthalmol*. 80: 906-10 (1996).
- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A: TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*. 46):327-34 (1998).
- Lacinová L, Klugbauer N, Hofmann F: Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys*. 19: 121-36 (2000a).
- Lacinová L, Klugbauer N, Hofmann F: Regulation of the calcium channel alpha(1G) subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology*. 39: 1254-66 (2000b).
- Lacinová L: Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys*. 24: 1-78 (2005).
- Lang F, Föller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM: Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol*. 205:147-57 (2005).
- Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, Lepple-Wienhues A, Szabo I, Gulbins E: Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*. 10: 417-28 (2000).
- Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M, Cheresch DA: Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol*. 121: 163-70 (1993).
- Lee EH, Joo CK: Role of transforming growth factor-beta in transdifferentiation and fibrosis of lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40: 2025-32 (1999).
- Lee H, O'Meara SJ, O'Brien C, Kane R: The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48: 4291-9 (2007).
- Legrand G, Humez S, Slomianny C, Dewailly E, Vanden Abeele F, Mariot P, Wuytack F, Prevarskaya N:  $\text{Ca}^{2+}$  pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *Biol Chem*. 276(50): 47608-14 (2001).
- Leresche N, Parri HR, Erdemli G, Guyon A, Turner JP, Williams SR, Asproдини E, Crunelli V: On the action of the anti-absence drug ethosuximide in the rat and

- cat thalamus. *J Neurosci.* 18: 4842-53 (1998).
- Levite M, Cahalon L, Peretz A, HersHKoviz R, Sobko A, Ariel A, Desai R, Attali B, Lider O: Extracellular K(+) and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and beta1 integrins. *J Exp Med.* 191: 1167-76 (2000).
- Lewit-Bentley A, Réty S: EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 10: 637-43 (2000).
- Lipskaia L, Lompré AM: Alteration in temporal kinetics of Ca<sup>2+</sup> signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell.* 96: 55-68 (2004).
- Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B: Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.* 15(9): 351-5 (1992).
- Lo WK: Adherens junctions in the ocular lens of various species: ultrastructural analysis with an improved fixation. *Cell Tissue Res.* 254: 31-40 (1988).
- Lock JG, Wehrle-Haller B, Strömbad S: Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol.* 18: 65-76 (2008).
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. New York, Thieme, 2. Aufl. 2006, 637 S.
- Mace OJ, Morgan EL, Affleck JA, Lister N, Kellett GL: Calcium absorption by Cav1.3 induces terminal web myosin II phosphorylation and apical GLUT2 insertion in rat intestine. *J Physiol.* 580: 605-16 (2007).
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y: Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 9487-92 (2000).
- Maidment JM, Duncan G, Tamiya S, Collison DJ, Wang L, Wormstone IM: Regional differences in tyrosine kinase receptor signaling components determine differential growth patterns in the human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 1427-35 (2004).
- Marcantonio JM, Vrensen GF: Cell biology of posterior capsular opacification. *Eye.* 13: 484-8 (1999).
- Mashima T, Naito M, Tsuruo T: Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene.* 18: 2423-30 (1999).
- Matter K, Balda MS: Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *J Cell Sci.* 120: 1505-11 (2007).
- Mattson MP, Chan SL: Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol.* 5: 1041-3 (2003).
- Mays RW, Beck KA, Nelson WJ: Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 6: 16-24 (1994).
- Meacock WR, Spalton DJ, Stanford MR: Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol.* 84: 332-6 (2000).
- Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L: The fibronectin



- synergy site modulates TGF-beta-dependent fibroblast contraction. *Biochem Biophys Res Commun.* 360: 709-14 (2007).
- Meißner A, Noack T: Proliferation of human lens epithelial cells (HLE-B3) is inhibited by blocking of voltage-gated calcium channels. *Pflugers Arch.* 457: 47-59 (2008).
- Meißner A: Calcium als Regulator zellulärer Wachstumsprozesse: die funktionelle Rolle von spannungsabhängigen Calciumkanälen in humanen Linsenepithelzellen. Universität Rostock, Dissertation, 2007, 114 S.
- Menapace R: Nachstarbildung nach Intraokularlinsenimplantation. Teil I: Genese und Prävention durch Optimierung konventioneller Linsenimplantate und Operations-techniken. *Ophthalmologe.* 104: 253-62 (2007).
- Meredith, JE Jr, Fazeli B, Schwartz MA: The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* 4: 953–961 (1993).
- Michelson G: Das Auge in Zahlen. Online Journal of Ophthalmology (<http://www.onjoph.com/patinfo/impressum.html>) Stand 19.12.2008
- Mishra SK, Hermsmeyer K: Selective inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by Ro 40-5967. *Circ Res.* 75: 144-8 (1994).
- Moccia F, Nusco GA, Lim D, Ercolano E, Gragnaniello G, Brown ER, Santella L:  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and membrane current activated by cADPr in starfish oocytes. *Pflugers Arch.* 446(5): 541-52 (2003).
- Müller F, Pietruschka G: Lehrbuch der Augenheilkunde. Leipzig, Thieme, 3. Auflage (1976), 446 S.
- Munaron L, Antoniotti S, Fiorio Pla A, Lovisolo D: Blocking  $\text{Ca}^{2+}$  entry: a way to control cell proliferation. *Curr Med Chem.* 11(12): 1533-43 (2004).
- Murray AW: Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell.* 116: 221-34 (2004).
- Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC: Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 1122-9 (2000).
- Nebe B, Holzhausen C, Rychly J, Urbaszek W: Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonist mibefradil. *Cardiovasc Drugs Ther.* 16: 183-93 (2002).
- Nebe B, Kunz F, Peters A, Rychly J, Noack T, Beck R: Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 242: 597-604 (2004).
- Nicotera P, Petersen OH, Melino G, Verkhatsky A: Janus a god with two faces: death and survival utilise same mechanisms conserved by evolution. *Cell Death Differ.* 14: 1235-6 (2007).
- Nilius B, Prenen J, Kamouchi M, Viana F, Voets T, Droogmans G: Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of  $\text{Ca}^{2+}$ - and volume-activated  $\text{Cl}^-$  channels in macrovascular endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 121: 547-55 (1997).
- Nishi O, Nishi K, Akaishi T, Shirasawa E: Detection of cell adhesion molecules in lens

- epithelial cells of human cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38: 579-85 (1997a).
- Nishi O, Nishi K, Fujiwara T, Shirasawa E: Types of collagen synthesised by the lens epithelial cells of human cataracts. *Br J Ophthalmol.* 79: 939-43 (1995).
- Nishi O, Nishi K, Mano C, Ichihara M, Honda T, Saitoh I: Inhibition of migrating lens epithelial cells by blocking the adhesion molecule integrin: a preliminary report. *J Cataract Refract Surg.* 23: 860-5 (1997b).
- Nishi O: Einfluss von Intraokularlinsenmaterial und –design auf die Nachstarentwicklung. *Ophthalmologe.* 102: 572-8 (2005).
- Nishi O, Nishi K, Sakanishi K: Inhibition of migrating lens epithelial cells at the capsular bend created by the rectangular optic edge of a posterior chamber intraocular lens. *Ophthalmic Surg Lasers.* 29: 587-94 (1998).
- Nishi O, Yamamoto N, Nishi K, Nishi Y: Contact inhibition of migrating lens epithelial cells at the capsular bend created by a sharp-edged intraocular lens after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 33: 1065-70 (2007).
- Nishi O: Posterior capsule opacification. Part 1: Experimental investigations. *J Cataract Refract Surg.* 25: 106-17 (1999).
- Nishimura N, Sasaki T: Regulation of epithelial cell adhesion and repulsion: role of endocytic recycling. *J Med Invest.* 55: 9-16 (2008).
- Nishita M, Inoue S, Tsuda M, Tateda C, Miyashita T: Nuclear translocation and increased expression of Bax and disturbance in cell cycle progression without prominent apoptosis induced by hyperthermia. *Exp Cell Res.* 244: 357-66 (1998).
- Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp-Technik. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl. 1996, 224 S.
- Nurse P: Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *Chembiochem.* 3: 596-603 (2002).
- Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Manabe K, Mori S, Nabekura T: Dual roles of plasmalemmal chloride channels in induction of cell death. *Pflugers Arch.* 448: 287-95 (2004).
- Okada Y, Maeno E: Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130: 377-83 (2001).
- Orrenius S, Nicotera P: The calcium ion and cell death. *J Neural Transm Suppl.* 43: 1-11 (1994).
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 552-65 (2003).
- Orrenius S: Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett.* 149: 19-23 (2004).
- Otey CA, Carpen O: Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58: 104-11 (2004).
- Pandey SK, Apple DJ, Werner L, Maloof AJ, Milverton EJ: Posterior capsule

- opacification: a review of the aetiopathogenesis, experimental and clinical studies and factors for prevention. *Indian J Ophthalmol.* 52: 99-112 (2004).
- Panner A, Wurster RD: T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium.* 40: 253-9 (2006).
- Parekh AB, Putney JW Jr: Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85: 757-810 (2005).
- Paterson CA, Delamere NA: ATPases and lens ion balance. *Exp Eye Res.* 78: 699-703 (2004).
- Pellegrin S, Mellor H: Actin stress fibres. *J Cell Sci.* 120: 3491-9 (2007).
- Perez-Moreno M, Fuchs E: Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell.* 11: 601-12 (2006).
- Petersen OH, Petersen CC, Kasai H: Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol.* 56: 297-319 (1994).
- Petrides PE, Löffler G: *Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin, Springer, 6. Aufl. 1998, 1155 S.
- Phipps DJ, Branch DR, Schlichter LC: Chloride-channel block inhibits T lymphocyte activation and signalling. *Cell Signal.* 8: 141-9 (1996).
- Pines J, Hunter T: Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? *Trends Cell Biol.* 1: 117-21 (1991).
- Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R: The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 17: 5298-308 (1998).
- Po AL, Zhang WY: What lessons can be learnt from withdrawal of mibefradil from the market? *Lancet.* 351: 1829-30 (1998).
- Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch.* Berlin, de Gruyter, 257. Aufl. 1994, 1722 S.
- Putney JW Jr, McKay RR: Capacitative calcium entry channels. *Bioessays.* 21: 38-46 (1999).
- Putney JW Jr: Cell biology. Channelling calcium. *Nature.* 410: 648-9 (2001).
- Rabsilber TM, Auffarth GU: Pharmakologische Ansätze zur Prävention der Cataracta secundaria. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 223: 559-67 (2006).
- Radisky DC: Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 118: 4325-6 (2005).
- Randall A, Tsien RW: Pharmacological dissection of multiple types of  $Ca^{2+}$  channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 15(4): 2995-3012 (1995).
- Regionales Rechenzentrum für Niedersachsen / Universität Hannover (RRZN): *Excel 7.0.* (Windows 95), 1. Aufl. 1996, 151 S.
- Ridley AJ: Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 114: 2713-22 (2001).
- Rodman DM, Harral J, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Reese KA, Fagan K: The low-voltage-activated calcium channel CAV3.1 controls proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Chest.* 128: 581S-582S (2005).
- Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R: Signal transduction by cell adhesion

- receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1242(1):77-98 (1995).
- Rosenmund, C; Westbrook, GL: Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron*. 10: 805–814 (1993).
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 238: 491-7 (1987).
- Sachs L: *Angewandte Statistik*. Berlin, Springer, 8. Auflage 1997, 881 S.
- Saika S, Kawashima Y, Miyamoto T, Okada Y, Tanaka SI, Ohmi S, Minamide A, Yamanaka O, Ohnishi Y, Ooshima A, Yamanaka A: Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunits, alpha-smooth muscle actin, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants. *Exp Eye Res*. 66: 283-94 (1998).
- Saika S, Ohmi S, Tanaka S, Ohnishi Y, Yamanaka A, Ooshima A. Light and scanning electron microscopy of rabbit lens capsules with intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg*. 23(5):787-94 (1997).
- Saika S: Relationship between posterior capsule opacification and intraocular lens biocompatibility. *Prog Retin Eye Res*. 23: 283-305 (2004).
- Santella L, Ercolano E, Nusco GA: The cell cycle: a new entry in the field of Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Mol Life Sci* 62: 2405-13 (2005).
- Santella L, Lim D, Moccia F: Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends Biochem Sci*. 29: 400-8 (2004).
- Sapora O, Di Carlo B: Cell signalling mechanisms and the control of cell life and death. *Radiat Prot Dosimetry*. 122: 210-20 (2006).
- SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA, 1997: JMP<sup>®</sup> Software, Version 3.2.1.
- Saxby L, Rosen E, Boulton M: Lens epithelial cell proliferation, migration, and metaplasia following capsulorhexis. *Br J Ophthalmol*. 82: 945-52 (1998).
- Sayer RJ, Brown AM, Schwindt PC, Crill WE: Calcium currents in acutely isolated human neocortical neurons. *J Neurophysiol*. 69: 1596-606 (1993).
- Schaller MD, Parsons JT: Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 6: 705-10 (1994).
- Schaller MD: Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1540: 1-21 (2001).
- Schmitt R, Clozel JP, Iberg N, Bühler FR: Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. Possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15: 1161-5 (1995).
- Schmitt-Gräff A, Pau H, Spahr R, Piper HM, Skalli O, Gabbiani G: Appearance of alpha-smooth muscle actin in human eye lens cells of anterior capsular cataract and in cultured bovine lens-forming cells. *Differentiation*. 43: 115-22 (1990).
- Schreiber R: Ca<sup>2+</sup> signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation. *J Membr Biol*. 205: 129-37 (2005).
- Schulz J, Schmidt J, Rück W: The value of nifedipine in the treatment of hypertension, coronary heart disease and myocardial infarction (post-infarction therapy). *Curr*

- Med Res Opin.13: 397-408 (1996).
- Schwartz MA: Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium. *J Cell Biol.* 120: 1003-10 (1993).
- Schwartz RS, Rybicki AC, Nagel RL: Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein pICln in human young red blood cells: association with actin. *Biochem J.* 327: 609-16 (1997).
- Shakibakei M, Mobasheri A: Beta1-integrins co-localize with Na, K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes. *Histol Histopathol.* 18: 343-51 (2003).
- Sharma N, Pushker N, Dada T, Vajpayee RB, Dada VK: Complications of pediatric cataract surgery and intraocular lens implantation. *J Cataract Refract Surg.* 25: 1585-8 (1999).
- Shepard AR, Rae JL: Ion transporters and receptors in cDNA libraries from lens and cornea epithelia. *Curr Eye Res.* 17: 708-19 (1998).
- Sherwin AL, Robb JP, Lechter M: Improved control of epilepsy by monitoring plasma ethosuximide. *Arch Neurol.* 28: 178-81 (1973).
- Shigemitsu T, Ishiguro K, Shimizu Y, Horiguchi M, Kasahara M, Arakaki S: Immunocytochemical features of lens after cataract tissue--signalling molecules (growth factors, cytokines, other signalling molecules), cytoskeleton proteins, cellular and extracellular matrix proteins. *Int Ophthalmol.* 23: 137-44 (1999).
- Shimaoka M, Takagi J, Springer TA: Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 31: 485-516 (2002).
- Short AD, Bian J, Ghosh TK, Waldron RT, Rybak SL, Gill DL: Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content is linked to control of cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 4986-90 (1993).
- Simon VR, Moran MF: SERCA activity is required for timely progression through G1/S. *Cell Prolif.* 34: 15-30 (2001).
- Smith PR, Saccomani G, Joe EH, Angelides KJ, Benos DJ: Amiloride-sensitive sodium channel is linked to the cytoskeleton in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 6971-5 (1991).
- Strobeck MW, Okuda M, Yamaguchi H, Schwartz A, Fukasawa K: Morphological transformation induced by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway requires suppression of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem.* 274: 15694-700 (1999).
- Stroh C, Schulze-Osthoff K: Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 5: 997-1000 (1998).
- Stump RJ, Lovicu FJ, Ang SL, Pandey SK, McAvoy JW: Lithium stabilizes the polarized lens epithelial phenotype and inhibits proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition. *J Pathol.* 210: 249-57 (2006).
- Stupack DG: The biology of integrins. *Oncology (Williston Park).* 21: 6-12 (2007).

- Sweet SA: Data analysis with SPSS. Allyn & Bacon, 1998, 204 pp.
- Takuwa N, Zhou W, Kumada M, Takuwa Y: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin is involved in growth factor-induced retinoblastoma gene product phosphorylation in human vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 306: 173-5 (1992).
- Tamiya S, Delamere NA: Studies of tyrosine phosphorylation and Src family tyrosine kinases in the lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: 2076-81 (2005).
- Tetz MR, Auffarth GU, Wersching C, Nimsger Ch, Vöcker HE: Vergleichende Untersuchung der Nachstarausrprägung und Vorderkapseltrübung bei Falt- und PMMA-Linsen. *Klin Monatsbl Augenheilkunde* 212: 23 (1998).
- Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, Thomas PE: Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 278: 12384-9 (2003).
- Tian B, Lessan K, Kahm J, Kleidon J, Henke C: Beta 1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem.* 277: 24667-75 (2002).
- Todorovic SM, Lingle CJ: Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol.* 79: 240-52 (1998).
- Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H: Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem J.* 317: 675-80 (1996).
- Trivedi RH, Werner L, Apple DJ, Pandey SK, Izak AM: Post cataract-intraocular lens (IOL) surgery opacification. *Eye.* 16: 217-41 (2002).
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP: Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 11: 431-8 (1988).
- Tsien RW, Tsien RY: Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol.* 6: 715-60 (1990).
- Tsien-RW & Wheeler-DB. Voltage-gated calcium channels. in: Carafoli-E, Klee-CB (eds): Calcium as a cellular regulator. pp.171-199. Oxford, UK, Oxford University Press 1999.
- van Aelst L, D'Souza-Schorey C: Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11: 2295-322 (1997).
- van der Flier A, Sonnenberg A: Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305: 285-98 (2001).
- van Loo G, Saelens X, Matthijssens F, Schotte P, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P: Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ.* 9: 1207-11 (2002).
- Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F: Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell*

- Calcium. 38: 291-302 (2005).
- Venkatachalam K, Montell C: TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 76: 387-417 (2007).
- Verkhatsky A: Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev.* 85: 201-79 (2005).
- Verkhatsky A: Calcium and cell death. *Subcell Biochem.* 45: 465-80 (2007).
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36: 131-49 (2003).
- Veroman S, Viikmaa M: Frequency of occurrence of abnormal cell types in organ-cultured fetal crystalline lenses and its dependence upon the culture medium used. *Ophthalmic Res.* 21: 101-5 (1989).
- Wang J, Zohar R, McCulloch CA: Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res.* 312: 205-14 (2006).
- Wang Z, Symons JM, Goldstein SL, McDonald A, Miner JH, Kreidberg JA.  $\alpha 3\beta 1$  integrin regulates epithelial cytoskeletal organization. *J Cell Sci.* 112:2925–2935 (1999).
- Wang Z, Estacion M, Mordan LJ:  $\text{Ca}^{2+}$  influx via T-type channels modulates PDGF-induced replication of mouse fibroblasts. *Am J Physiol.* 265: C1239-46 (1993).
- Weaver MS, Toida N, Sage EH: Expression of integrin-linked kinase in the murine lens is consistent with its role in epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells in vitro. *Mol Vis.* 13: 707-18 (2007).
- Welker HA, Wiltshire H, Bullingham R: Clinical pharmacokinetics of mibefradil. *Clin Pharmacokinet.* 35: 405-23 (1998).
- Welsh CF, Assoian RK: A growing role for Rho family GTPases as intermediaries in growth factor- and adhesion-dependent cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta.* 1471: M21-9 (2000).
- Whitaker M: Calcium microdomains and cell cycle control. *Cell Calcium.* 40: 585-92 (2006).
- Williams MJ, Hughes PE, O'Toole TE, Ginsberg MH: The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol.* 4: 109-12 (1994).
- Wondergem R, Gong W, Monen SH, Dooley SN, Gonce JL, Conner TD, Houser M, Ecay TW, Ferslew KE: Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. *J Physiol.* 532: 661-72 (2001).
- Wormstone IM, Del Rio-Tsonis K, McMahon G, Tamiya S, Davies PD, Marcantonio JM, Duncan G: FGF: an autocrine regulator of human lens cell growth independent of added stimuli. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 1305-11 (2001).
- Wormstone IM, Liu CS, Rakic JM, Marcantonio JM, Vrensen GF, Duncan G: Human lens epithelial cell proliferation in a protein-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38: 396-404 (1997).
- Wormstone IM: Posterior capsule opacification: a cell biological perspective. *Exp Eye Res.* 74: 337-47 (2002).



- Wu S, Zhang M, Vest PA, Bhattacharjee A, Liu L, Li M: A mibefradil metabolite is a potent intracellular blocker of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in pancreatic beta-cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 292: 939-43 (2000).
- Wunderlich K, Pech M, Eberle AN, Mihatsch M, Flammer J, Meyer P: Expression of connective tissue growth factor (CTGF) mRNA in plaques of human anterior subcapsular cataracts and membranes of posterior capsule opacification. *Curr Eye Res.* 21: 627-36 (2000).
- Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L: Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium.* 32: 279-305 (2002).
- Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA: Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem.* 279: 33024-34 (2004).
- Yang S, Huang XY:  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem.* 280: 27130-7 (2005).
- Yao K, Ye PP, Tan J, Tang XJ, Shen Tu XC: Involvement of PI3K/Akt pathway in TGF-beta2-mediated epithelial mesenchymal transition in human lens epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 40: 69-76 (2008).
- Yeh S, Scholz DL, Liou W, Rafferty NS: Polygonal arrays of actin filaments in human lens epithelial cells. An aging study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27: 1535-40 (1986).
- Yoshida J, Ishibashi T, Nishio M: Antiproliferative effect of  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers on human epidermoid carcinoma A431 cells. *Eur J Pharmacol.* 472: 23-31 (2003).
- Yoshida J, Ishibashi T, Nishio M: G1 cell cycle arrest by amlodipine, a dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Pharmacol.* 73: 943-53 (2007).
- Yu WG, Sokabe M: Hypotonically induced whole-cell currents in A6 cells: relationship with cell volume and cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ . *Jpn J Physiol.* 47: 553-65 (1997).
- Zhang XH, Ji J, Zhang H, Tang X, Sun HM, Yuan JQ: Detection of integrins in cataract lens epithelial cells. *J Cataract Refract Surg.* 26: 287-91 (2000).
- Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S: Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 6: 644-51 (1999).
- Zuckerman JB, Chen X, Jacobs JD, Hu B, Kleyman TR, Smith PR: Association of the epithelial sodium channel with Apx and alpha-spectrin in A6 renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 274: 23286-95 (1999).
- Zutter MM: Integrin-mediated adhesion: tipping the balance between chemosensitivity and chemoresistance. *Adv Exp Med Biol.* 608: 87-100 (2007).

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungen

A	Ampere
AKT/PKB, Akt	Proteinkinase B
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AVD	apoptotic volume decrease
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
BSS	hypotone Pufferlösung
Ca <sup>2+</sup> , Cs <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>	Kalzium-, Cäsium-, Chlorid-, Kalium-, Magnesium-, Natrium- Ionen
CaM	Calmodulin
D	Tag(e)
DIDS	4,4'- diisothiocyano-2,2'-disulfonic stilbene
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-N,N-tetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETX	Ethosuximid
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	(fluorescence activated cell sorting) Durchflusszytometrie
FCS	fötales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
H	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hFB	primäre humane Fibroblasten
hLEZ	primäre humane Linsenepithelzellen
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Inhibition
ILK	Integrin-linked kinase
IOL	Intraokularlinse
M	mol/l
Mibe	Mibefradil (1S,2S)-2- [2-[(3-(2-Benzimidazolyl)-

	propyl]methylamino]ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl methoxyacetate dihydrochloride (Ro 40-5967), Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
min	Minute
MW	Mittelwert
N	Stichprobenumfang
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-/Kalium-ATPase
NPPB	5-nitro-2-(3- phenylpropylamino) benzoic acid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCO	posterior capsule opacification
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PPS	Physiologische Standardlösung (physiological standard solution)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RVD	regulatory volume decrease
S	Sekunde
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TGF	Tissue growth factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
α-SMA	Alpha-Smooth muscle actin
Ω	Ohm

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.2.1. Anatomie und Embryologie der Augenlinse.....	3
Abb.2.2. Morphologische Charakteristik epithelialer und mesenchymaler Zellen.....	4
Abb.2.3. Schematische Darstellung eines Fokalkontakts mit den Wechselwirkungen der Integrinmoleküle mit extra- und intrazellulären Proteinen. ....	10
Abb.2.4. Schematische Darstellung der Signaltransduktion über Integrin-Zellrezeptoren in Epithelien.....	12
Abb.2.5. Schematische Darstellung grundlegender Komponenten des Calcium Signalings.....	13
Abb.2.6. Phasen des Zellzyklus in Säugerzellen. ....	16
Abb.2.7. Pathologisches Ca <sup>2+</sup> -Signaling reguliert den Zelltod via Apoptose oder Nekrose.....	18

Abb.2.8. Schematische Darstellung der $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmechanismen durch zelluläre Membranen (aus Verkhratsky 2007).	20
Abb.2.9. allgemeine Struktur eines spannungsabhängigen $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals.	23
Abb.2.10. Strukturformel des Kalziumantagonisten Mibefradil.	24
Abb.4.1. Strukturformel des Kalziumantagonisten Ethosuximid.	28
Abb.4.2. Strukturformel des Kalziumantagonisten Nifedipin.	29
Abb.4.3. Stromantworten bei Ausbildung der Ganzzelleableitung und Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung.	44
Abb.5.1. hLEZ-Proliferation vom Kapselsackexplantat.	49
Abb.5.2. Morphologie von hLEZ auf dem Deckglas in Abhängigkeit von der Lage zum Kapselsackexplantat.	50
Abb.5.3. Fluoreszenzmikroskopischer Synthesenachweis extrazellulärer Matrixproteine (Kollagen I, II, IV, Fibronectin und Laminin) in hLEZ.	51
Abb.5.4. Anordnung des Aktin-Zytoskelettes in primären hLEZ und in HLE-B3-Zellen.	52
Abb.5.5. Ausprägung von $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) in unbehandelten hLEZ.	53
Abb.5.6. Verteilung des Tight junction-Proteins ZO-1 in kultivierten hLEZ in Abhängigkeit von der Lage zum Kapselsack-Explantat.	54
Abb.5.7. Expression und Verteilung des Tight Junction-assoziierten Proteins ZO-1 in verschiedenen Zelltypen.	55
Abb.5.8. Flow-zytometrische Messung der Expression von Integrin-Untereinheiten in kultivierten primären humanen LEZ.	56
Abb.5.9. Elektrophysiologische Messung von Stromkomponenten des Gesamtstromes in kultivierten hLEZ.	58
Abb.5.10. Morphologieänderung von hLEZ unter Mibefradil-Einfluss.	59
Abb.5.11. Einfluss von Mibefradil auf die Zellkontaktfläche von hLEZ.	60
Abb.5.12. Änderung der Verteilung des Tight junction-assoziierten Proteins ZO-1 in hLEZ unter Mibefradil-Einfluss.	61
Abb.5.13. Änderung der Integrinexpression in HLE-B3-Zellen nach 24 h Inkubation mit 5-30 $\mu\text{M}$ Mibefradil.	62
Abb.5.14. Mibefradil-induzierte Schädigung des Hornhautendothels im Cornea-Explantat.	63
Abb.5.15. Mibefradil-induzierte irreversible Schädigung des Hornhautendothels infolge vollständiger Zelldissoziation im Cornea-Explantat.	64
Abb.5.16. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Membranoberfläche von primären Kaninchen-Endothelzellen im natürlichen Zellverband.	65
Abb.5.17. Streulichteigenschaften (FSC/SSC) von HLE-B3-Zellen nach 24 h Mibefradil-Inkubation.	66
Abb.5.18. Einfluss von Mibefradil auf die Synthese von Kollagen I, II, IV, Fibronectin und Laminin in hLEZ.	68

Abb.5.19. Nachweis der Phosphatidylserin-Exposition an der Aussenseite der Zellmembran nach Inkubation mit Mibefradil.....	69
Abb.5.20. Apoptose in HLE-B3-Zellen nach 24 h Mibefradil-Inkubation. ....	71
Abb.5.21. Apoptose: Einfluss von Mibefradil auf die Lokalisation des proapoptotischen Proteins Bax (grün) in hLEZ. ....	72
Abb.5.22. Caspase-3-Aktivität in hLEZ unter Mibefradil-Einfluß (Fluoreszenzmikroskopie). ....	73
Abb.5.23. Mibefradil-induzierte Fragmentierung des F-Aktin-Zytoskeletts (rot) und DNA-Oligonukleotidabspaltung .....	74
Abb.5.24. Ethosuximid induziert keine Fragmentierung von F-Aktin (rot) und DNA-Oligonukleotidabspaltung. ....	75
Abb.5.25. Nifedipin induziert keine Fragmentierung von F-Aktin (rot) und DNA-Oligonukleotidabspaltung. ....	76
Abb.5.26. Proliferation und Apoptose von HLE-B3-Zellen nach 24 h Mibefradil-Inkubation. ....	77
Abb.5.27. Beispiel der Whole-cell-Stromableitung einer Linsenepithelzelle). ....	78
Abb.5.28. Inhibition spannungsabhängiger $Ca^{2+}$ -Ströme in hLEZ durch Mibefradil. ....	78
Abb.5.29. Beispiele von Netto-whole-cell Strömen. ....	79
Abb.6.2. Zusammenfassung der Mibefradil-induzierten zellulären Effekte in hLEZ. ...	94

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tab.2.1. Nachstarbedingte Gewebeveränderungen. ....	5
Tab.2.2. Beispiele für Zellverbindungen in Epithelien (nach Alberts et al. 2005). ....	7
Tab.2.3. Vorkommen und Typen von $Ca^{2+}$ -Kanälen. ....	21
Tab.4.1. Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.....	33
Tab.4.2. Übersicht über die verwendeten Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper.....	34
Tab.4.3. Übersicht über die verwendeten Fluorophor-Konjugate. ....	34
Tab.4.4. Übersicht über die zur Analyse der Integrin-Expression in HLE-B3 Zellen verwendeten Primärantikörper. ....	41
Tab.4.5. Übersicht über die zur Analyse der Integrin-Expression in HLE-B3 Zellen verwendeten Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper. ....	41
Tab.4.6. Übersicht über die zum Nachweis früher Apoptosestadien sowie der Proliferation und Apoptose in HLE-B3 Zellen verwendeten Fluorophor-Konjugate und Fluorochrome. ....	41
Tab.6.1. Zusammenfassung der morphologischen Zelleigenschaften der untersuchten primären humanen Linsenepithelzellen und daraus abgeleitete Zuordnung zum Zelltypus. ....	83

## 9.4 Lösungen, Puffer und Medien

### Nährmedium für die Kultivierung von hLEZ:

Für die Zellkultivierung primärer humaner Linseneithelzellen kamen gebrauchsfertige Nährmedien (Komplettmedium) mit folgender Zusammensetzung zur Anwendung:

176 ml	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM), (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
10 %	Fetales Kälberserum (FKS), (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
1 %	Bufferall (Sigma)
1 %	Gentamicin, 1:8 (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
200 ml Endvolumen, steril, auf 37°C vorgewärmt	

### Kulturmedium für primäre Hornhautendothelzellen (Hornhautmedium I):

(Zentralapotheke, Universität Rostock)

100 ml	Earle's MEM (10x; von Biochrom)
1 %	Penicillin-Streptomycin (10 000 E; von Biochrom),
1 %	Amphotericin B (25 µg/ml; von Biochrom),
1 %	L-Glutamin (200mM; von Biochrom),
12,5 ml	HEPES-Pufferlösung 50x (1M; von Biochrom)
29,3 ml	Natriumhydrogencarbonat NaHCO <sub>3</sub> 7,5% (Biochrom) ad pH7,2
2 %	FCS (Gibco)
destilliertes H <sub>2</sub> O ad 1000 ml Endvolumen, steril	

### Medium zum Entquellen der primären Hornhautendothelzellen (Hornhautmedium II):

(Zentralapotheke, Universität Rostock)

100 ml	Earle's MEM (10x; Biochrom)
1 %	Penicillin-Streptomycin (10 000 E; Biochrom),
1 %	Amphotericin B (25 µg/ml; Biochrom),
1 %	L-Glutamin (200mM; Biochrom),
12,5 ml	HEPES-Pufferlösung 50x (1M; Biochrom)
29,3 ml	Natriumhydrogencarbonat NaHCO <sub>3</sub> 7,5% (Biochrom) ad pH7,2
2 %	FCS (Gibco)
60g	Dextran T500 (Pharmacia)
destilliertes H <sub>2</sub> O ad 1000 ml Endvolumen, steril	

**Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2 (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>)**

(Zentralapotheke, Universität Rostock):

1,390 g	di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O
0,280 g	Natriumhydrogenphosphat x 1 H <sub>2</sub> O
8,400 g	Natriumchlorid

destilliertes H<sub>2</sub>O ad 1000 ml Endvolumen; dampfsterilisiert

**Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2 (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>)**

(Zentralapotheke, Universität Rostock):

4,335 g	Natriumchlorid
0,100 g	Kaliumchlorid
0,575 g	di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O
0,100 g	Natriumdihydrogenphosphat
0,050 g	Kalziumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O
0,050 g	Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O

destilliertes H<sub>2</sub>O ad 500 ml Endvolumen; dampfsterilisiert

**Einbettmedium für die Fluoreszenzmikroskopie:**

30 g	Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
12 g	Polyvinylalkohol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
30 ml	Aqua dest.
0,5 g	Phenol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Nach gründlichem Durchmischen wurde das Gemisch 12 Stunden bei 40-45 °C stehen gelassen. Danach wurden 60 ml Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland) 0,1M, pH 8,5 zugegeben und das fertige Einbettmedium bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

**PSS (Physiologische Standardlösung), mit NaOH auf pH 7,3 gepuffert:**

125,0	mM	NaCl
11,0	mM	Glucose (erst unmittelbar vor Gebrauch zufügen)
10,0	mM	HEPES
4,8	mM	KCl
2,5	mM	CaCl <sub>2</sub>
1,2	mM	MgCl <sub>2</sub>
1,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>



**Kalium-reiche Pipettenlösung, mit KOH auf pH 7,3 gepuffert:**

120	mM	KCl
11,0	mM	Glucose (erst unmittelbar vor Gebrauch zufügen)
10,0	mM	HEPES
5,0	mM	NaCl
5,0	mM	Oxalacetat
5,0	mM	Succinat
1,2 EGTA, 3,6 K <sup>+</sup>	mM	K <sup>+</sup> -EGTA
2,0	mM	Pyruvat
1,2	mM	MgCl <sub>2</sub>
1,2	mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Zugabe von 5,16 ml Aqua bidest. für 100 ml Endvolumen

**Cäsium-Pipettenlösung ohne Natrium und Kalium, mit CsOH auf pH 7,3 gepuffert:**

127,4	mM	CsCl
11,0	mM	Glucose (erst unmittelbar vor Gebrauch zufügen)
10,0	mM	HEPES
5,0	mM	Oxalacetat
5,0	mM	Succinat
1,2 EGTA, 3,6 Cs <sup>+</sup>	mM	Cs <sup>+</sup> -EGTA
2,0	mM	Pyruvat
1,2	mM	MgCl <sub>2</sub>

Zugabe von 86,17 ml Aqua bidest. für 100 ml Endvolumen

## 9.5 Verwendete elektrophysiologische Messprotokolle

### 9.5.1 Messprotokolle zur Erfassung spannungsaktivierter nicht-inaktivierender Membranströme:

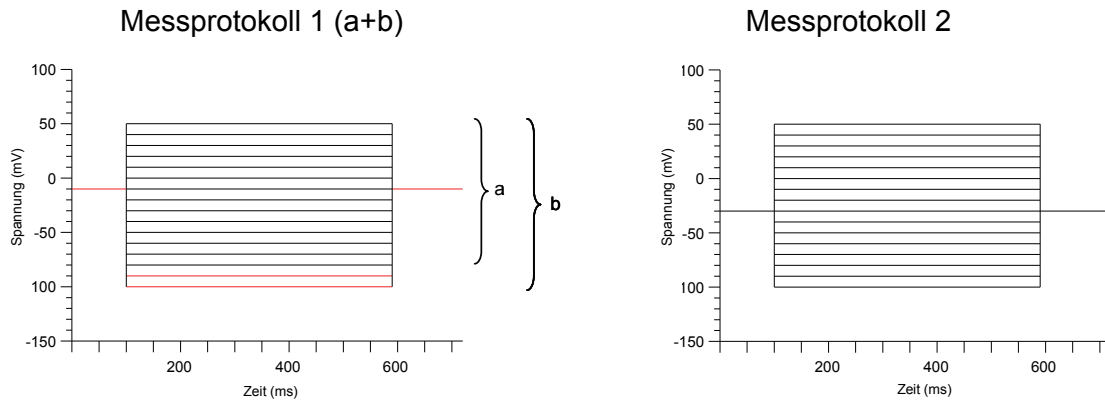


Abb. 9.2.1. schematische Darstellung der Spannungssprungprotokolle 1a,b und 2. Protokoll 1: Haltepotential bei -10 mV für 200 ms, 14 Spannungssprünge (a) bzw. 16 Spannungssprünge (b). Protokoll 2: Haltepotential bei -30 mV für 200 ms, 16 Spannungssprünge, beginnend bei -100 mV, im 10 mV-Intervall ansteigend bis zu +50 mV.

### 9.5.2 Messprotokolle zur Erfassung spannungsaktivierter inaktivierender Membranströme:

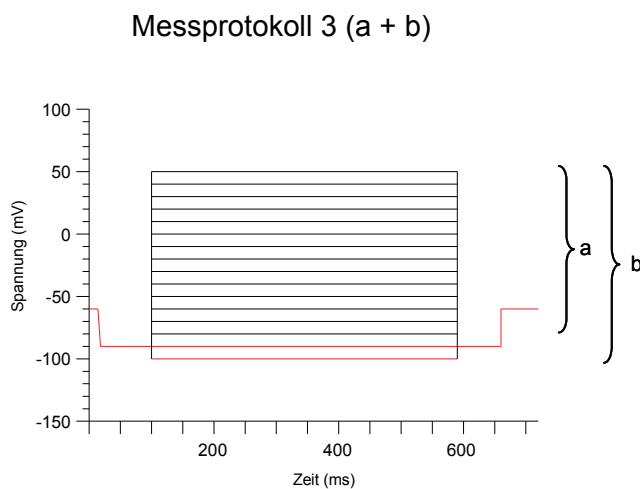


Abb. 9.2.2. schematische Darstellung der Spannungssprungprotokolle 3a,b. Haltepotential bei -10 mV, Vorpuls -90 mV, gefolgt vom Hauptpuls (Testspannungssprung von je 500 ms Dauer) und Nachpuls (-90mV). 14 Spannungssprünge (a) bzw. 16 Spannungssprünge (b, beginnend bei -80 bzw. 100 mV, im 10 mV-Intervall ansteigend bis zu +50 mV.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und die benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Promotionsbehörde vorgelegt.

Friederike Kunz

Rostock, 23.12.2008

## wissenschaftliche Beiträge im Rahmen des DFG-Projektes Nr. NE 560/5-1

---

### Publikationen:

Beck R, Kunz F, Nebe B, Sternberg K, Guthoff R: *In-vitro-Versuche zum Einfluss von an PMMA gebundenem Mibefradil auf die Adhäsion humaner Linsenepithelzellen*. DGII Band, Biermann Verlag GmbH Köln (Hrsg. Auffarth GU, Völcker HE, Kohnen T, Demeler U: 16. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen-Implantation und refraktive Chirurgie (2002) 255-260.

Nebe B, Kunz F, Peters A, Rychly J, Noack T, Beck R: *Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells*. Graefe's Arch Clin Exp Ophtalmol 242 (2004) 597-604.

### Kurzbeiträge:

Kunz F, Beck R, Rychly J, Guthoff R, Nebe B: *Induction of apoptosis in lens epithelial cells by a calcium antagonist correlates with impaired integrin-mediated adhesion*. Biol Cell 93 (2001) 222.

### Poster /Abstracts:

Kunz F, Beck R, Rychly J, Guthoff R, Nebe B: *Induction of apoptosis in lens epithelial cells by a calcium antagonist correlates with impaired integrin-mediated adhesion*. - 1. Deutsch-Französischer Zellbiologie-Kongress (Strasbourg), 2001.

Kunz F, Sternberg K, Beck R, Nebe B, Rychly J, Schmitz K-P, Guthoff R: *Coupling of a calcium antagonist to PMMA lenses as a strategy to prevent posterior capsule opacification*. Tagungsband, Symposium der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft DOG: Biomaterials in Ophthalmology, Rostock-Warnemünde, 26. - 27.04.2002.

Kunz F, Nebe B, Beck R, Rychly J, Guthoff R, Noack T: *Effect of the calcium channel antagonist Mibefradil on ion currents in primary human lens epithelial cells*. Proceedings, XX. Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons, ESCRS, Nizza, Frankreich, 07. - 11.09.2002.

Kunz F, Nebe B, Beck R, Noack T, Rychly J, Guthoff R: *Induktion von Apoptose in humanen Linsenepithelzellen durch den T-Kanal-Kalziumantagonisten Mibefradil in vitro als Therapieansatz für die Nachstarprävention*. Jubiläumstagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Proceedings P087, Berlin, 26. - 29.09.2002.

Meißner A, Nebe B, Beck R, Kunz F, Guthoff R, Noack T: *The T-Type calcium channel inhibitor Mibefradil inhibits potassium currents in human lens epithelial cells (hLEC)*. DOG Berlin September 2005.

Vorträge bei Fachveranstaltungen:

*Projektvorstellung: Adhäsionsinhibition von primären Linsenepithelzellen durch T-Kanal-Kalziumantagonisten in vitro als Therapieansatz für die Nachstarprävention*. - Universitäts-Augenklinik Rostock, 14.11.2001.

*Coupling of a calcium antagonist to PMMA lenses as a strategy to prevent posterior capsule opacification*. - Symposium der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft „Biomaterials in Ophthalmology“ (Rostock/Warnemünde), 26./27.4.2002.

*Adhäsionsinhibition von primären Linsenepithelzellen durch T-Kanal-Kalziumantagonisten in vitro*. - VII. Physiologentreffen im Ostseeraum (Kiel), 24.5.2002.

*Adhäsionsinhibition von primären Linsenepithelzellen durch T-Kanal-Kalziumantagonisten in vitro als Therapieansatz für die Nachstarprävention*. - Universitäts-Augenklinik Rostock, 29.5.2002.

## **Dank**

...sagen möchte ich hier all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Joachim Rychly danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und seine anteilnehmende fachliche Begleitung der Arbeitsfortschritte.

Frau Prof. Ria Beck von der Universitätsaugenklinik danke ich für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials und die engagierte Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Thomas Noack danke ich für die Bereitstellung des Patch-Clamp Arbeitsplatzes samt Zubehör und die Unterstützung bei der Einarbeitung in dieses Verfahren.

Frau Priv.-Doz. Dr. Barbara Nebe möchte ich für die Übernahme der fachlichen Betreuung dieser Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und zahlreiche wertvolle Anregungen und Hinweise danken. Zugleich danke ich allen eben Genannten für die Möglichkeit, zahlreiche Arbeitsergebnisse in Fachkreisen präsentieren zu können.

Herrn Prof. Ludwig Jonas, danke ich dafür, ausgewählte Proben elektronenmikroskopisch untersuchen zu können. Herrn Gerhard Fulda danke ich für seine Geduld und Akribie bei der Auswertung am Rasterelektronenmikroskop sowie seine Gabe, die zeitintensiven Sitzungen zu einem wissenschaftlichen Erlebnis zu machen. Den technischen Mitarbeitern danke ich für die hervorragende Probenaufbereitung.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Annelie Peters, ohne deren exzellente technische Unterstützung die Einarbeitung länger gedauert hätte und die bei den Laborarbeiten stets mit Rat oder einem aufmunterndem Wort zur Seite stand, wenn es einmal nicht so vorwärts ging. Ebenso herzlich bedanke ich mich bei allen anderen damaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und vielfältigen Erfahrungsaustausch.

Ein ganz besonderer Dank gehört meinen Eltern für alles, was sie mir auf den Weg mitgegeben haben.

Meinem Mann Sven danke ich dafür, dass er mich in allen Dingen meines Vorhabens unterstützt hat. Und meinen Kindern Solveig und Fridtjof danke ich für etliche geschenkte Stunden, die sie mit Papa, Oma oder Opa verbrachten, damit ich am Manuskript arbeiten konnte.